

UNIVERSITE DE GENEVE

Section de pharmacie
Pharmacie galénique

FACULTE DES SCIENCES

Professeur P. BURI

**ETUDE DU TRANSPORT DE TROIS FLAVONOÏDES
A TRAVERS DES MEMBRANES
ARTIFICIELLES ET BIOLOGIQUES**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, **■**
mention sciences pharmaceutiques

par

Charles-André CREVOISIER **■**

de

Bâle-Ville

Thèse N° 1676

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1974
■

ETUDE DU TRANSPORT DE TROIS FLAVONOÏDES
A TRAVERS DES MEMBRANES
ARTIFICIELLES ET BIOLOGIQUES

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences,
mention sciences pharmaceutiques

par

Charles-André CREVOISIER

de

Bâle-Ville

Thèse N° 1676

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur extraordinaire P. Buri, directeur de thèse et d'une commission composée du professeur ordinaire P. Boymond (Faculté des sciences) et du professeur J.M. Aiache (Université de Clermont-Ferrand), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 juillet 1974

Le doyen :
Jean Muller

Thèse No 1676



Que le professeur P. Buri trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance, tant pour les encouragements que pour l'intérêt qu'il a bien voulu me témoigner au cours de ce travail entrepris sous sa direction.

J'exprime tous mes remerciements au professeur P. Boymond, président de la Section de pharmacie, qui a bien voulu présenter cette thèse à la Faculté des sciences et faire partie du jury.

Ma gratitude s'adresse également au professeur J.M. Aiache, professeur agrégé à la Faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand, qui a eu l'amabilité de siéger dans le jury de cette thèse.

Je remercie le Département scientifique de Zyma S.A. Nyon pour son aide financière et technique.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues du laboratoire de pharmacie galénique pour leur intérêt et leur collaboration, en particulier Mademoiselle J. Boucherat, qui a si efficacement participé à toute la partie expérimentale de cette étude, le docteur E. Doelker pour ses nombreux conseils, Monsieur J. Wagner pour l'analyse des courbes sur ordinateur, Madame J. Blanc pour la dactylographie du manuscrit et Monsieur J.P. Vuagniaux pour la réalisation des schémas.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

T A B L E D E S M A T I E R E S

Introduction et justification du travail	p. 1
--	------

PREMIERE PARTIE

I.	Etude du transport des flavonoïdes à travers des membranes artificielles poreuses	3
I.1	Généralités	3
I.1.1	Structure des flavonoïdes	3
I.1.2	Solubilité	4
I.1.3	Absorption dans l'ultraviolet	4
I.1.4	Activité biologique et pharmacodynamie	5
I.1.5	Pharmacocinétique	5
I.1.6	Modèles de transport	6
I.2	Membranes artificielles solides	7
I.2.1	Membranes polymérisées poreuses (membranes hétérogènes)	7
I.2.2	Membranes polymérisées non poreuses (membranes homogènes)	8
I.2.3	Membranes lipidiques composées	8
I.3	Etude théorique	9
I.3.1	Analyse cinétique	9
I.3.2	Vitesse de transport en présence de tensio-actifs	14

I.4	Partie expérimentale	p.	17
I.4.1	Choix des flavonoïdes		17
I.4.2	Détermination du coefficient de diffusion D		18
I.4.3	Détermination du coefficient de partage apparent K_{app} .		18
I.4.4	Choix des adjuvants		21
I.4.5	Mode opératoire		22
I.4.6	Effets des conditions expérimentales sur la vitesse de transport des principes actifs en présence d'adjuvants		25
I.5	Résultats et interprétation		27
I.5.1	Vitesse de transport des flavonoïdes sans adjuvants		28
I.5.2	Influence du Tween ^R 80		28
I.5.3	Influence du laurylsulfate de sodium		33
I.5.4	Influence du dioctyl sulfosuccinate de sodium		39
I.5.5	Influence du taurocholate de sodium		39
I.5.6	Influence de la carboxyméthylcellulose sodique		45
I.5.7	Influence du Carbopol 941 ^R		52
I.5.8	Influence du Polyéthylèneglycol 200		52
I.5.9	Influence du pH		57

DEUXIEME PARTIE

II.	Etude du transport des flavonoïdes à travers des membranes lipidiques composées solides non poreuses	p. 68
II.1	Généralités	68
II.2	Etude théorique	70
II.3	Partie expérimentale	72
II.3.1	Choix des produits	72
II.3.2	Purification de la lécithine	74
II.3.3	Préparation de la solution d'Ultramid 1C ^R à 20%	74
II.3.4	Composition et préparation des membranes	75
II.4	Tests de contrôle des membranes	76
II.4.1	Contrôle de l'absence de pores	76
II.4.2	Epaisseur des membranes	77
II.5	Résultats et interprétation	78

TROISIEME PARTIE

III.	Etude du transport des flavonoïdes à travers des membranes liquides organiques dans un modèle à trois phases	p. 85
III.1	Généralités	85
III.2	Importance de la saturation des phases liquides	87
III.3	Etude théorique	88
III.4	Partie expérimentale	91
III.4.1	Choix des produits	91
III.4.2	Description des modèles de transport à membranes liquides	92
III.4.3	Mode opératoire	96
III.5	Résultats et interprétation	98
III.5.1	Vitesses de transfert de la CAT sans adjuvants	98
III.5.2	Influence des pH "physiologiques"	101
III.5.3	Influence de la carboxyméthylcellulose sodique	105
III.5.4	Influence de la lécithine	107
III.5.5	Influence du dispositif de la cellule de partage	112
III.5.6	Vitesses de transfert du SEC-Na et du Tri-HR	120

QUATRIEME PARTIE

IV.	Etude du transport des flavonoïdes à travers la paroi intestinale	p. 121
IV.1	Méthode d'absorption intestinale <i>in vitro</i>	121
IV.1.1	Généralités	121
IV.1.2	Partie expérimentale	122
IV.1.3	Résultats et interprétation	130
IV.2	Méthode d'absorption intestinale <i>in situ</i>	185
IV.2.1	Généralités	185
IV.2.2	Partie expérimentale	187
IV.2.3	Résultats et interprétation	195
	Conclusions générales et résumé	209
	Bibliographie	217

INTRODUCTION ET JUSTIFICATION DU TRAVAIL

Le but principal de ce travail est l'étude des phénomènes de transport de quelques flavonoïdes à travers différents types de membranes.

A notre connaissance, on n'a pas encore procédé à une étude comparative de la cinétique de transport de ces dérivés en solution. Pour cette raison, nous avons essayé, en premier lieu, de mieux comprendre le comportement *in vitro* à l'aide de membranes artificielles.

Le second but de cette étude est de mettre en évidence les facteurs physico-chimiques influençant la vitesse de transport à travers des membranes artificielles ou biologiques, par des essais *in vitro* ou *in situ*. L'évaluation *in vitro* du rôle de ces paramètres peut fournir des informations valables pour le choix du principe actif et l'élaboration de la forme galénique finale. Les expériences effectuées à partir de solutions aqueuses permettent d'obtenir les caractéristiques de perméabilité.

L'ensemble des tests réalisés permettent de déterminer la fraction transportée ou absorbée, ainsi que les facteurs qui freinent ou augmentent la vitesse de transport.

Enfin, le recours à différents modèles permet d'évaluer et de comparer la reproductibilité et la signification des résultats fournis par chacun d'eux.

Parmi les conclusions que nous pourrons tirer, beaucoup ne seront applicables qu'à nos conditions d'expérience, sans qu'il soit permis d'extrapoler pour d'autres substances ou d'autres paramètres testés.

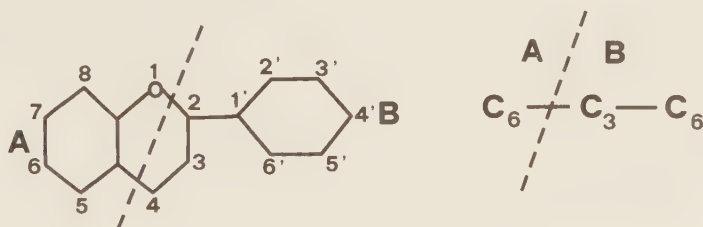
PREMIERE PARTIE

I. Etude du transport des flavonoïdes à travers des membranes artificielles poreuses

I.1 Généralités

I.1.1 Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments d'origine végétale, dérivés du phényl-2 benzodihydropyrane. Leur squelette correspond donc à la formule générale :



La partie A de cette molécule provient de la condensation de trois unités d'acétate, alors que la partie B se rattache au groupe du phénylpropane.

Un ou plusieurs des carbones 3',4',5',3,4,5,6,7 et 8 sont substitués par un nombre variable de groupements hydroxyles ou méthoxyles (très rarement, on trouve des dérivés méthylés en C₆ et C₈), alors que le degré de saturation du noyau pyranique peut varier de deux manières : existence de 1 à 3 doubles liaisons et présence ou absence d'une fonction hydroxyle ou cétonique en C₄.

Les aglucones résultant des différentes substitutions de la molécule et du degré d'oxydation de la chaîne C_3 , sont très fréquemment transformés dès leur biosynthèse en O ou en C-hétérosides.

Il s'ensuit que, malgré l'uniformité de leur structure fondamentale, les flavonoïdes présentent des propriétés physico-chimiques variant dans de très larges limites.

I.1.2 Solubilité

La plupart des flavonoïdes sont assez solubles dans les alcools. Quelques hétérosides se dissolvent dans l'eau, surtout à chaud, mais les aglucones et les dérivés polyméthylés sont solubles dans divers solvants lipophiles, en particulier dans l'éther.

I,1.3 Absorption dans l'ultraviolet

En étudiant l'absorption dans l'ultraviolet, on observe toujours deux bandes caractéristiques dont la position varie sous l'influence du nombre et de la position des hydroxyles, des méthoxyles et des oses. L'introduction d'hydroxyles dans le noyau du chromane ne modifie guère la position de la seconde bande, mais elle provoque un déplacement de la première vers les grandes longueurs d'onde, déplacement qui augmente avec le nombre des substituants. Quant aux hétérosides, leur spectre est principalement influencé par la position de l'ose.

I.1.4 Activité biologique et pharmacodynamie

Le degré d'activité biologique dépend de la position et du nombre de groupements hydroxyles, méthoxyles ou cétoniques dans la molécule considérée, qui en modifient le coefficient de partage.

Ainsi, on a attribué le mécanisme d'activité des dérivés flavoniques à une formation de :

- quinones, avec les dérivés 3',4',-dihydroxylés.

Le fait que ces dérivés peuvent se transformer facilement en quinones laisse supposer leur rôle probable dans les phénomènes biologiques d'oxydo-réduction.

- chélates, avec les dérivés de l'hydroxy-3 flavone, de l'hydroxy-5 flavone et les dérivés 3',4'-dihydroxylés.

- chalcones : dans certains cas, il y a possibilité d'isomérisation par ouverture du cycle pyranique et formation de chalcones.

Ces possibilités de modification de la molécule de base, ainsi que la formation éventuelle de dimères notamment dans le cas des catéchines, ont donné naissance à plusieurs hypothèses concernant l'action biologique des flavonoïdes.

I.1.5 Pharmacocinétique

Une revue générale des nombreuses publications concernant l'absorption, le métabolisme et l'élimination des flavonoïdes, nous met en présence de théories et de résultats peu concordants. Cette diversité de résultats doit être attribuée

aux différences des méthodes utilisées, des animaux de laboratoires et des dérivés étudiés.

D'une manière générale, on constate une faible absorption des flavonoïdes, alors que l'élimination est toujours assez rapide.

I.1.6 Modèles de transport

Avant l'avènement et le développement de la biopharmacie, on considérait principalement l'effet global d'un médicament, selon les résultats, mesurés ou constatés, d'essais pharmacologiques ou cliniques. On n'accordait que peu d'importance aux différents processus situés entre l'administration du médicament et son effet thérapeutique.

Ensuite, on a essayé de différencier les diverses phases qui peuvent s'enchaîner simultanément ou successivement, comme la libération d'un médicament d'une forme galénique, le transport, l'absorption, la distribution, les liaisons avec les protéines, l'accumulation, la biotransformation ou l'élimination.

Dans la plupart des cas, l'étude isolée de ces phénomènes n'est possible qu'à l'aide de modèles qui cherchent à imiter d'une manière techniquement réalisable et significative, les processus biologiques et à éliminer ou contrôler les effets perturbateurs et les facteurs secondaires; pour cela, on ne fait appel qu'aux paramètres principaux du système naturel. Les résultats obtenus par la création et l'utilisation de ces modèles ne permettent pas de tirer des conclusions sur l'ensemble du phénomène biologique, mais de mieux reconnaître l'importance d'un paramètre isolé.

I.2 Membranes artificielles solides

Il est possible de classer les membranes artificielles utilisées dans les modèles d'étude des phénomènes de transport en plusieurs catégories.

I.2.1 Membranes polymérisées poreuses (membranes hétérogènes)

Les molécules passent à travers les pores de la membrane sans être vraiment solubilisées dans ses constituants. Dans ce cas, la facilité de transport d'une substance est strictement dépendante de la dimension des pores et de la molécule pénétrante, de la composition et de la viscosité de la solution elle-même. Le transport d'une molécule en solution est généralement une mesure de la probabilité de sa pénétration et de sa diffusion à travers les pores. Ces membranes de dialyse, ou membranes filtrantes, sont utilisées pour séparer des molécules de dimensions très différentes, devant en plus posséder approximativement le diamètre des pores^{1,2}.

Les membranes de cellophane, inertes et "semi-perméables", sont souvent utilisées pour de telles expériences. En outre, on utilise la dialyse pour caractériser la formation de complexes par des mesures de perméation. Cette technique est limitée à l'étude d'interactions entre des substances qui diffusent à travers une membrane poreuse et des agents complexants ou tensio-actifs, dont la diffusion est nulle ou presque nulle³⁻⁸. L'utilisation de polyélectrolytes a été préconisée pour augmenter l'absorption de substances ioniques⁹.

I.2.2 Membranes polymérisées non poreuses (membranes homogènes)

Ce sont des membranes synthétiques, qui sont principalement formées d'un seul matériau polymère. La perméation à travers ce type de membrane dépend de la diffusion d'une molécule à la surface proximale de la membrane, de l'adsorption et de la solubilité de la molécule pénétrante dans la membrane.

Récemment, on a utilisé une nouvelle membrane ressemblant au point de vue fonctionnel à une membrane biologique, de type lipidique non-polaire, dans le cas d'une diffusion passive et d'une substance non ionisée. C'est la membrane de Silastic^R, un polymère du diméthyl-siloxane, qui possède le grand avantage d'être pratiquement imperméable à certains ions de la solution tampon (p.ex. phosphate, hydrogène, chlorure), maintenant ainsi approximativement le même gradient de pH pendant une période déterminée.

Garrett et coll.¹⁰⁻¹² ont utilisé cette membrane polymérisée pour évaluer, contrôler et prédire la diffusion de quelques principes actifs. Puis, d'autres auteurs ont travaillé avec ce type de membrane¹³ en étudiant l'influence de la longueur des chaînes alcoyle¹⁴, de l'adsorption physique¹⁵, de la composition du solvant, de la solubilité de la substance testée¹⁶ et de l'interaction avec des tensio-actifs, des adsorbants ou d'autres substances^{17,18}.

I.2.3 Membranes lipidiques composées

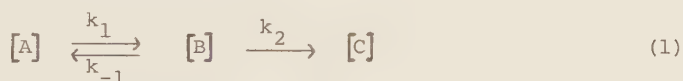
Ce sont des membranes lipidiques ou phospholipidiques formées à l'aide d'un support mécanique, qui doit être inerte et

maintenir l'intégrité physique de la membrane; la phase lipidique est contenue dans le support.

I.3 Etude théorique

I.3.1 Analyse cinétique

Le mécanisme de transport à travers une membrane peut être décrit par le principe suivant :



où $[A]$, $[B]$ et $[C]$ sont les concentrations respectives dans les compartiments A, B et C. $[B]$ représente la concentration dans la membrane. Puisque la concentration $[C]$ dans le compartiment récepteur est très petite, la vitesse de retour de C en B peut être négligée. Grâce à la symétrie du modèle, les constantes de vitesse k_2 et k_{-1} sont égales; si la vitesse globale est apparemment de premier ordre, la constante k_1 détermine alors la vitesse de transport¹⁹.

Le transport à travers une membrane se manifeste généralement en deux étapes. Initialement, il y a une diffusion du principe actif dans le solvant jusqu'à la surface exposée de la membrane. La deuxième étape du transport peut à nouveau être subdivisée en deux stades : établissement d'un gradient de concentration uniforme des molécules pénétrantes à travers la membrane, puis lorsque celui-ci est établi, diffusion uniforme constante.

Ce deuxième stade est la diffusion en régime constant.

En admettant que l'interaction principe actif-solvant et solvant-solvant n'ait pas d'influence importante sur le flux du principe actif, on peut décrire la diffusion en régime constant par la loi de Fick :

$$J = - D \left(\frac{dc}{dx} \right) \quad (2)$$

où J est le flux ou la quantité de substance traversant une section plane de la membrane par unité de surface et unité de temps, $\frac{dc}{dx}$ est le gradient de concentration, c'est-à-dire la chute de concentration dc sur la distance parcourue dx et D est le coefficient de diffusion, exprimant le nombre de molécules-grammes de substance diffusant par unité de temps à travers l'unité de surface lorsque le gradient de concentration $\frac{dc}{dx}$ est égal à 1.

La vitesse de transport en régime constant étant expérimentalement difficile à réaliser, on a recours au concept de la vitesse de transport en régime quasi-constant, ce qui signifie que le gradient de concentration ne change que faiblement en fonction du temps. Dans ce cas, le flux du principe actif à travers une barrière d'épaisseur h et de surface S, peut être représenté par :

$$J = \frac{V_c \cdot dC}{dt} = - \frac{V_a \cdot dA}{dt} = \frac{S \cdot D}{h} \cdot (A-C)$$

ou :

$$\frac{dC}{dt} = \frac{S \cdot D}{V_c \cdot h} \cdot (A-C) \quad (3)$$

V_a et V_c sont les volumes des solutions de chaque côté de la barrière.

Puisque la quantité totale du soluté, T, reste constante dans le système et que celle contenue dans la membrane est négligeable, l'équation de la balance des masses devient :

$$T = AV_a + CV_c$$

d'où

$$A = \frac{T - CV_c}{V_a} \quad (4)$$

En substituant l'expression (4) dans l'équation (3) on obtient :

$$\frac{dC}{dt} = \frac{S \cdot D}{h \cdot V_c} \cdot \left[\frac{T}{V_a} - \frac{C (V_c + V_a)}{V_a} \right] \quad (5)$$

Dans le cas particulier où $V_a = V_c = V$ et où C est initialement zéro, l'équation (5) se réduit à :

$$\frac{dC}{dt} = \frac{S \cdot D}{V \cdot h} \left[\frac{T}{V} - 2 C \right] \quad (6)$$

$\frac{T}{V}$ est la concentration initiale A_o dans le compartiment A.

Si on exprime le terme $\frac{S \cdot D}{V}$ par une constante P, après intégration (entre les limites $C = 0$ et C, et $t = 0$ et t) de l'équation (6), on obtient l'équation finale suivante :

$$\log \left[\frac{A_o - 2 C}{A_o} \right] = \left[\frac{- 2 P}{2,303 \cdot h} \right] \cdot t \quad (7)$$

Puisque la cellule de diffusion est maintenue fixe et grâce à la géométrie des compartiments, le rapport de la surface

de la membrane en contact avec la solution et des volumes de la solution dans chaque compartiment reste constant pendant toute l'expérience.

L'équation (7) est une expression adéquate pour décrire les processus de diffusion dans les conditions d'état quasi-stationnaire²⁰⁻²³. En déterminant expérimentalement C, A₀ et t et en portant $\log \left[\frac{A_0 - 2C}{A_0} \right]$ en fonction du temps sur un graphique, on obtient une droite dont la pente b est égale à $- 2 P/2,303 \cdot h$, constante de vitesse de premier ordre. La pente a été calculée selon la méthode des moindres carrés, au moyen de l'ordinateur CDC 3800 du Centre Cantonal Genevois d'Informatique (langage FORTRAN).

P est le coefficient de perméabilité, définissant la vitesse de transport d'un principe actif à travers une barrière après établissement d'un gradient de concentration uniforme. Ce coefficient de perméabilité est valable pour les conditions d'expériences choisies. Pour que P corresponde à une vraie constante, plusieurs conditions, concernant la membrane elle-même et les solutions, s'imposent :

a) Membrane

- Pas d'adsorption par la membrane qui, de plus, doit être physiquement et chimiquement inerte et présenter une surface effective et une épaisseur constantes.
- Pas de propriétés de partage de la membrane poreuse.
- Pas d'intervention de l'encombrement (friction) au niveau des pores, dont le diamètre doit être bien supérieur à celui des molécules.

b) Solutions

- Volume et température constants.
- Concentration dans le compartiment C beaucoup plus faible que dans le compartiment A.
- Pas de rôle déterminant de la viscosité.
- Concentrations identiques à l'intérieur des phases.
- Différence minime des pressions hydrostatiques.
- Pas d'interaction soluté-solvant et solvant-solvant.
- Pas de rôle du degré de dissociation.
- Vitesse d'agitation élevée, tout en évitant une turbulence au niveau de la membrane.

Il est possible de calculer la vraie constante de diffusion et de la relier à des conditions d'expérience différentes, si l'ensemble de ces conditions mentionnées est connu et peut être bien défini.

De plus, si on s'intéresse à des caractéristiques de sélectivité d'une membrane poreuse, on devrait connaître la surface d'un seul pore, le nombre des pores qui constituent la membrane effective, ainsi que leur rayon et leur longueur. Si l'on s'attache moins aux propriétés de séparation d'une membrane qu'à la vitesse de transport d'un principe actif à travers cette membrane, la valeur numérique de la porosité ne doit pas absolument être connue, ce paramètre étant compris dans le coefficient de perméabilité. En fait, le coefficient de perméabilité est applicable à des essais avec une membrane poreuse ou non poreuse²⁴.

P, dans l'équation (7), comprend un ensemble de paramètres propres à la membrane et au principe actif. Selon *Nogami et coll.*²¹

$$P = f \cdot D \cdot K \cdot S / V \quad (8)$$

où f est la constante de la membrane, D la constante de diffusion dans la membrane qui est maintenue constante et K la constante de distribution.

Pour une membrane poreuse, la surface effective est égale au produit de la surface apparente et de la porosité; l'épaisseur effective est égale au produit de l'épaisseur apparente et de la tortuosité.

I.3.2 Vitesse de transport en présence de tensio-actifs

Dans un système de tensio-actifs, le transport d'un principe actif est réalisé en deux étapes; l'une résulte du mouvement moléculaire suivant la loi de Fick et l'autre de l'incorporation dans la structure des micelles. Cette deuxième étape n'est pas interprétable par les lois conventionnelles de diffusion.

L'interaction d'un principe actif avec une autre substance, adjuvant ou substance endogène dans des systèmes biologiques, forme souvent des complexes qui ont des propriétés physico-chimiques fortement différentes de celles du principe actif.

Les tensio-actifs peuvent être utilisés pour faciliter ou pour freiner le passage d'une substance à travers la membrane.

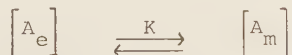
Beaucoup de travaux sur les effets des tensio-actifs, d'ordre plutôt général, mais intéressant les phénomènes de transport, ont été publiés ces dernières années²⁵⁻²⁹.

La concentration en tensio-actif joue un rôle important. A de très faibles concentrations, les molécules amphiphiles existent séparément sous forme subcolloïdale. Il y a une adsorption des molécules à l'interface air-eau, l'adsorption augmente avec l'augmentation de la concentration totale des molécules amphiphiles. A la concentration micellaire critique (= CMC), l'interface et la solution interne sont saturées de monomères. Au-dessus de la CMC, il se forme des agrégats de dimension colloïdale.

Cette micellisation réduit l'énergie libre du système. Ces solutions aqueuses micellaires peuvent être considérées comme des systèmes colloïdaux à deux phases. La phase dispersée consiste en micelles colloïdales, l'eau représentant la phase continue.

Un principe actif, présent dans un tel système, est distribué parmi ces deux phases et son coefficient de partage entre la phase micellaire et l'eau caractérise cette distribution.

L'équilibre entre ces deux phases peut être exprimé par



et le coefficient de partage est donné par

$$K = \frac{\left[A_m \right]}{\left[A_e \right]} \quad (9)$$

où $\left[A_m \right]$ est la quantité de soluté dans les micelles et $\left[A_e \right]$ celle de la phase continue.

En divisant respectivement, dans l'équation (9), pour exprimer les concentrations, le numérateur et le dénominateur par V_m et V_e , représentant les volumes de la phase micellaire et de la phase externe, on obtient l'expression suivante :

$$K = \frac{(A_m)}{(A_e)} \cdot \frac{V_e}{V_m} \quad (10)$$

En remplaçant, dans l'équation (10), V_e par $V_{tot} - V_m$, on obtient :

$$K = \frac{(A_m)}{(A_e)} \cdot \frac{(V_{tot} - V_m)}{V_m} \quad (11)$$

Si on suppose que la quantité de tensio-actif non micellaire est négligeable, on peut écrire :

$$\frac{V_m}{V_{tot}} = V \quad (12)$$

où V représente la fraction de volume du tensio-actif.

En substituant (12) dans (11), on a :

$$K = \frac{(A_m)}{(A_e)} \cdot \frac{1 - V}{V} \quad (13)$$

En remplaçant dans (13) A_m par $A_{tot} - A_e$ et après réarrangement de cette équation, on obtient :

$$\frac{(A_e)}{(A_{tot})} = \frac{1 - V}{KV + 1 - V} \quad (14)$$

En supposant que V est petit comparé au volume total³⁰, on peut écrire :

$$\frac{(A_e)}{(A_{tot})} = \frac{1}{KV + 1} \quad (15)$$

Le rapport $(A_e) / (A_{tot})$ est égal au rapport des vitesses de transport en présence et en absence de tensio-actif; on obtient donc l'expression finale :

$$R = \frac{\text{Vitesse de transport en présence de tensio-actif}}{\text{Vitesse de transport sans tensio-actif}} = \frac{1}{K \cdot V + 1} \quad (16)$$

Cette expression est uniquement valable pour des concentrations égales ou supérieures à la CMC.

I.4 Partie expérimentale

I.4.1 Choix des flavonoïdes

Nous nous sommes limité, au cours de cette étude, aux trois dérivés suivants :

a) (+)-cyanidanol-3; synonyme : (+)-catéchine (= CAT).

Les catéchines sont des polyphénols flavanoliques.

b) (+)-épicatechine-2-sulfonate de sodium (= SEC-Na).

C'est un dérivé semi-synthétique hydrosoluble de la (+)-épicatechine.

c) Tri-hydroxyéthyl-rutoside (= Tri-HR).

Ce dérivé est un produit hydrosoluble d'hydroxyéthylation du rutoside, ayant les trois fonctions phénoliques en 7,3' et 4' éthérifiées par des restes hydroxyéthyle. Cette substance est décrite par Courbat et coll.^{31,32}.

Comme on le verra plus loin, on peut s'attendre à une grande différence des propriétés physico-chimiques de ces trois substances, résumées dans le tableau 1.

I.4.2 Détermination du coefficient de diffusion D

Puisque, dans certaines conditions, D est indépendant de la nature et de la porosité de la membrane, nous avons d'abord déterminé les coefficients intégraux de diffusion, indiquant la mobilité des molécules d'une manière quantitative, ce qui permet de mieux comprendre le rôle joué par la nature chimique des molécules elles-mêmes.

Ces coefficients de diffusion ont été déterminés selon la méthode décrite par Goldberg et Higuchi³³, qui utilisent une membrane d'argent poreuse aux propriétés constantes.

La constante L de la cellule a été déterminée par une série de 6 mesures (L = 85,5) et toutes les expériences effectuées à 25° C (voir tabl. 1).

I.4.3 Détermination du coefficient de partage apparent K_{app} .

Les valeurs de K_{app} ne sont valables que dans les conditions où elles ont été déterminées. Il s'agit d'une information comparative pour une série de dérivés homologues.

Parmi les solvants organiques de différentes polarités que nous avons testés, ce n'est que pour le 1-octanol^{*}, fortement polaire ($\epsilon = 10,25$, 20°C), que nos dérivés ont montré une certaine affinité (voir tabl. 1).

10 ml de solution aqueuse (non tamponnée) sont agités dans des ampoules à décanter avec 40 ml de 1-octanol, pendant 2 h, à température ambiante ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Après séparation des deux phases limpides (env. 20 h), la concentration dans la phase aqueuse est déterminée par spectrophotométrie, en utilisant comme solution de référence l'eau saturée d'octanol. La concentration dans la phase organique est déterminée par différence, sans tenir compte d'une éventuelle association ou dissociation.

K_{app} est calculé d'après la formule suivante :

$$K_{\text{app}} = \frac{V_L (C_a^O - C_a^f)}{V_a \cdot C_a^f} \quad (17)$$

V_L = volume de la phase lipidique

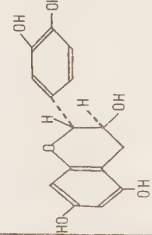
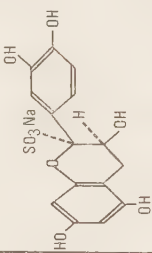
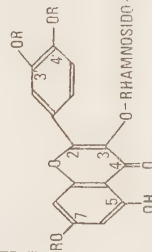
V_a = volume de la phase aqueuse

C_a^O = concentration initiale dans la phase aqueuse

C_a^f = concentration finale dans la phase aqueuse

^{*} 1-octanol puriss. (Fluka A.G., CH-9470 Buchs).

Tableau 1
Propriétés physico-chimiques

	(+)-catéchine (= CAT)	(+)-épicatéchine-2-sul- fonate-Na (= SEC-Na)	Tri-hydroxyéthyl-rutoside (= Tri-HR)
Structure chimique			
Poids moléculaire	362, 3	464, 4	742, 7
Solubilité dans H ₂ O en % (20° C)	0,2	très soluble	très soluble
Coefficient de diffusion [cm ² ·sec ⁻¹]	5,09*	6,99**	3,28***
Coefficient de partage apparent 1-octanol/eau (20 ± 2° C)	2,266	presque nul	0,037
Max. d'absorption U.V. en nm (solutions aqueuses)	278,5	278,5	253,5 et 350
Autoxydation en milieu légèrement alcalin ****	dégradé ³⁴⁻³⁷		supposé stable ³⁸⁻⁴¹
Stabilité des spectres d'absorp- tion U.V. en milieu alcalin	instable		stable ⁴²⁻⁴⁵

* concentration initiale: 4·10⁻³ M
 ** concentration initiale: 5·10⁻³ M
 *** concentration initiale: 10⁻³ M
 **** pas testé

I.4.4 Choix des adjuvants

Nous avons étudié l'influence de la présence et de la concentration des adjuvants suivants :

Tensio-actifs :

Tween^R 80 (= monoléylpolysorbitanne)^a

Laurylsulfate de sodium^b

Taurocholate de sodium^c

Dioctyl sulfosuccinate de sodium^d

Agents viscosifiants :

Propylèneglycol (= PG)^e

Polyéthylèneglycol 200 (= PEG 200)^f

Carboxyméthylcellulose sodique (= CMC-Na)^g

Carbopol 941^{R h}

Méthylcellulose (= MC)ⁱ

Solutions tampon :

Pour les expériences avec la CAT et le SEC-Na :

pH = 2,00 (citrate de sodium/acide chlorhydrique,
Titrisol Merck).

Pour les expériences avec le Tri-HR : pH = 2,20
(citrate de Na/acide chlorhydrique, selon Sørensen),
pH = 8,0 (phosphate, selon Sørensen).

a, b, c, e, f Siegfried S.A., CH-4800 Zofingue.

d Merck A.G., Darmstadt RFA.

g Type 12 M 31 P (Hercules Inc., Wilmington,
Del., USA).

h Goodrich Chemical Company (Cleveland, Ohio, USA).

i Purum, 25 cP (Fluka A.G., CH-9470 Buchs).

I.4.5 Mode opératoire

Nous avons choisi la membrane de cellophane de Du Pont de Nemours^{*}, type PD 215, d'une épaisseur de 25 μ à l'état sec et 55 μ à l'état hydraté, en vertu de sa reproductibilité et de sa porosité favorable pour les substances étudiées.

Quant à notre modèle de transport, il s'agit de la cellule de plexiglas mise au point par Yotsuyanagi^{**} pour l'étude des phénomènes de transport à travers des membranes artificielles solides. Ce modèle a déjà été décrit et utilisé dans nos laboratoires par Doelker et Buri⁴⁶ pour étudier la libération d'une amine salifiée par un polyélectrolyte hydrosoluble.

La membrane découpée est trempée 1 h dans l'acétone pour la dégraisser. Elle est ensuite lavée 5 fois à l'eau distillée, puis conservée 24 h dans l'eau, afin que son gonflement atteigne un état d'équilibre. Pour les essais avec adjuvants, la membrane est conservée dans les solutions de ces adjuvants aux concentrations correspondantes.

On enfle les agitateurs à 4 pales dans les tubes extérieurs de la cellule, on enduit les joints d'une fine couche de silicone, puis on place avec une pincette la membrane au centre de la cellule. Les deux compartiments de la cellule sont vissés et cette dernière, ainsi montée, est solidement fixée dans un bain thermostatisé à $30^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C, puis chaque agitateur est relié par un joint à un moteur synchrone (Crouzet, type 82334, 60 t/min).

*

E.I. Du Pont de Nemours + Co, Wilmington, Del. (USA).

**

Dr T. Yotsuyanagi, College of Pharmacy, University of Michigan, Ann Arbor, (USA).

Toutes les solutions sont préparées le jour même avec de l'eau distillée récemment bouillie et maintenues dans un bain thermostatisé à $30^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{ C}$.

Les hydrogels de méthylcellulose et de carboxyméthylcellulose sodique sont préparés selon les indications de la Ph. Helv. VI. L'hydrogel de Carbopol 941^R est obtenu par agitation mécanique, puis neutralisé à pH 7,0 avec de la soude caustique 10%.

On remplit simultanément les deux compartiments de la cellule, respectivement avec 42 ml de solution contenant le flavonoïde (compartiment A) et 42 ml d'eau distillée (compartiment C). Il est très important de chasser les bulles d'air éventuellement formées à la surface de la membrane.

Au temps zéro, l'eau forme le milieu récepteur du compartiment C, sauf pour les expériences avec le PEG 200 et les solutions tampon, qui se trouvent en concentration égale dans les deux compartiments de la cellule.

On enclenche le dispositif d'agitation et le chronomètre dès que les cellules sont remplies. On prélève 3 ml de solution dans le compartiment récepteur, à des temps déterminés, et on effectue directement le dosage au spectrophotomètre (Perkin-Elmer 139, cuves de 1 cm) à la longueur d'onde appropriée, puis on reverse immédiatement les 3 ml dans le compartiment C, ce qui permet de maintenir les conditions constantes. Chaque expérience est effectuée quatre fois.

Remarques

- Pour des raisons pratiques et à cause des relativement faibles changements de concentration entre chaque prélèvement,

les mesures ne sont effectuées que dans le compartiment récepteur. Lors de la dernière prise d'échantillon, par contre, les mesures se font de chaque côté pour établir le bilan final.

- Un contrôle préalable de l'étanchéité de chaque cellule, au moyen d'une solution de bleu de méthylène, et de la constance des volumes dans les deux compartiments, doit révéler une étanchéité absolue et l'absence de changement de volume en A et C.
- Puisque des essais préliminaires ont montré que les adjuvants (à l'exception du PEG 200 et du taurocholate de sodium) ne passent pas à travers la membrane de cellophane, on a utilisé l'eau comme référence dans le dosage spectrophotométrique. Pour les essais avec des solutions tampon, on a recours à une cuve de référence remplie avec la solution correspondante. Le taurocholate de sodium passe en faible quantité à travers la membrane et le dosage direct des catéchines révèle que ce tensio-actif absorbe également à la longueur d'onde des catéchines étudiées (278,5 m μ); on a donc utilisé la méthode de dosage simultané à deux longueurs d'onde⁴⁷, après avoir vérifié que la présence du taurocholate ne déplace pas le maximum d'absorption des catéchines. Aux longueurs d'onde $\lambda_1 = 380$ m μ et $\lambda_2 = 245$ m μ , la CAT et le SEC-Na ont des propriétés d'absorption molaire additives par rapport au taurocholate de sodium.

La présence de PEG 200 dans la solution réceptrice n'interfère pas avec le dosage direct des principes actifs; le PEG ne présente pas de maximum d'absorption entre 250-290 m μ ⁴⁸.

I.4.6 Effets des conditions expérimentales sur la vitesse de transport des principes actifs en présence d'adjuvants

a) Pression osmotique de la solution et perméabilité de la membrane aux molécules de tensio-actifs

Si une solution est séparée du milieu récepteur (solvant) par une membrane uniquement perméable aux molécules de ce solvant, il s'établit alors une pression osmotique. Un courant de molécules de solvant se manifeste dans la direction de la solution. C'est le cas, si un tensio-actif n'est présent que dans un seul compartiment.

Le flux des molécules d'eau du compartiment C dans la direction du compartiment A, en direction du gradient osmotique, peut provoquer un transport de principes actifs, après leur passage de A en C, dans la même direction et contre le gradient de concentration.

Dans nos conditions d'expérience (choix de la membrane, des concentrations en macromolécules et du temps d'expérience), l'effet de la pression osmotique peut être considéré comme négligeable pour tous les adjuvants, à l'exception du PEG 200.

La CMC-Na à 1%, par exemple, provoque, après 6 h, une augmentation du volume dans le compartiment A de + 0,7 ml, soit 1,7%, due à un passage de molécules d'eau dans cette direction.

Pour les autres adjuvants, l'augmentation du volume dans le compartiment A est inférieure à celle provoquée par la CMC-Na à 1% et se situe dans les limites d'erreurs expérimentales.

Le gradient de pression osmotique provoqué par le PEG 200 est éliminé par une concentration égale dans les compartiments A et C. De plus, les polyéthylèneglycols de faible poids moléculaire ont été reconnus capables de passer une barrière de cellophane^{5, 48-50}. Ainsi, le gradient de concentration et le gradient osmotique ont pu être supprimés dans nos conditions de travail. Des expériences de contrôle ont montré que la membrane de cellophane est imperméable à tous les adjuvants étudiés, à l'exception du PEG 200 et du taurocholate de sodium, mais que des faibles impuretés de tensio-actifs peuvent passer la membrane. Par contre, la perméabilité de la membrane de cellophane aux macromolécules joue un rôle important dans les expériences prolongées jusqu'à l'équilibre.

Différents auteurs ont prouvé que la membrane de cellophane est imperméable aux micelles de polysorbate^{5, 8, 51-53}.

b) Viscosité des solutions

Puisque le transport des principes actifs à travers une membrane dépend également de la diffusion des molécules dans le compartiment A, la vitesse de transport globale est influencée par la viscosité des solutions contenues dans ce compartiment.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de la viscosité sur le transport des principes actifs. Selon *Withington* et *Collett*⁸, la constante de vitesse de dialyse de l'acide salicylique à 0,1%

en présence de Tween^R 20 à 5% (viscosité relative 1,3), ne diffère que dans la limite des erreurs expérimentales de celle obtenue sans tensio-actif.

D'après Ågren et coll.⁴⁸, la différence de vitesse de transport du phénol 0,1 M en présence de PEG 6000 à 5% n'est pas significativement différente de celle obtenue avec une solution identique sans adjuvant.

Dans notre étude, l'effet éventuel de la viscosité n'est pas pris en considération. De plus, la vitesse d'agitation n'a jamais été modifiée.

I.5 Résultats et interprétation

Nous passerons successivement en revue l'influence de chaque adjuvant sur la vitesse de transport des trois flavonoïdes testés. Par contre, chaque tableau récapitulatif (tabl. 3 à 5, p. 63 à 67), pour faciliter la lecture et la consultation, correspond à un des dérivés étudiés avec tous les paramètres testés.

Puisque le coefficient de perméabilité augmente en fonction de l'augmentation de la concentration initiale (tabl. 2), on a maintenu fixe cette dernière pour chaque dérivé.

Tableau 2

*Pourcentage de SEC-Na dans le compartiment C après 2 h, en fonction de la concentration initiale **

Concentration	$5 \cdot 10^{-4}$ M	10^{-3} M	10^{-2} M	$5 \cdot 10^{-2}$ M
%	0,75 ($\pm$ 0,21)	0,91 ($\pm$ 0,01)	3,16 ($\pm$ 0,19)	5,78 ($\pm$ 0,09)

* Les valeurs entre parenthèses expriment les écarts-types de la moyenne de 2 expériences.

La seule variable des conditions d'expérience est la concentration en adjuvant, de sorte qu'il est possible de faire des comparaisons valables dans la gamme d'expériences de chaque principe actif.

I.5.1 Vitesse de transport des flavonoïdes sans adjuvants

Le graphique de la fig. 1 représente la cinétique de transport de premier ordre de la CAT, du Tri-HR et du SEC-Na. Cette différence de vitesse de transport pourrait être attribuée aux différences de polarité des trois dérivés. En effet, le transport n'est fonction ni du coefficient de diffusion ni du poids moléculaire (cf. tabl. 1).

I.5.2 Influence du Tween^R 80

La CMC du Tween^R 80 a été déterminée par *Kakemi* et *coll.*⁵⁴; d'après ces auteurs, elle correspond à une concentration voisine de 0,01%.

CAT (fig. 2, tabl. 3)

Une concentration micellaire en Tween^R 80 diminue le coefficient de perméabilité apparent de la CAT, d'une manière très fortement significative, laissant supposer que la vitesse de transport dépend de la concentration du principe actif "libre", puisque la catéchine incorporée dans les micelles ne participe pas au processus de transfert. La présence du tensio-actif non-ionique réduit la disponibilité de la CAT par complexation ou solubilisation micellaire.

TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

FIG. 1

- CAT ($A_0 = 2,5 \cdot 10^{-4}$ moles/litre)
- ▲ Tri-HR ($A_0 = 5,0 \cdot 10^{-5}$ moles/litre)
- SEC-Na ($A_0 = 2,0 \cdot 10^{-3}$ moles/litre)

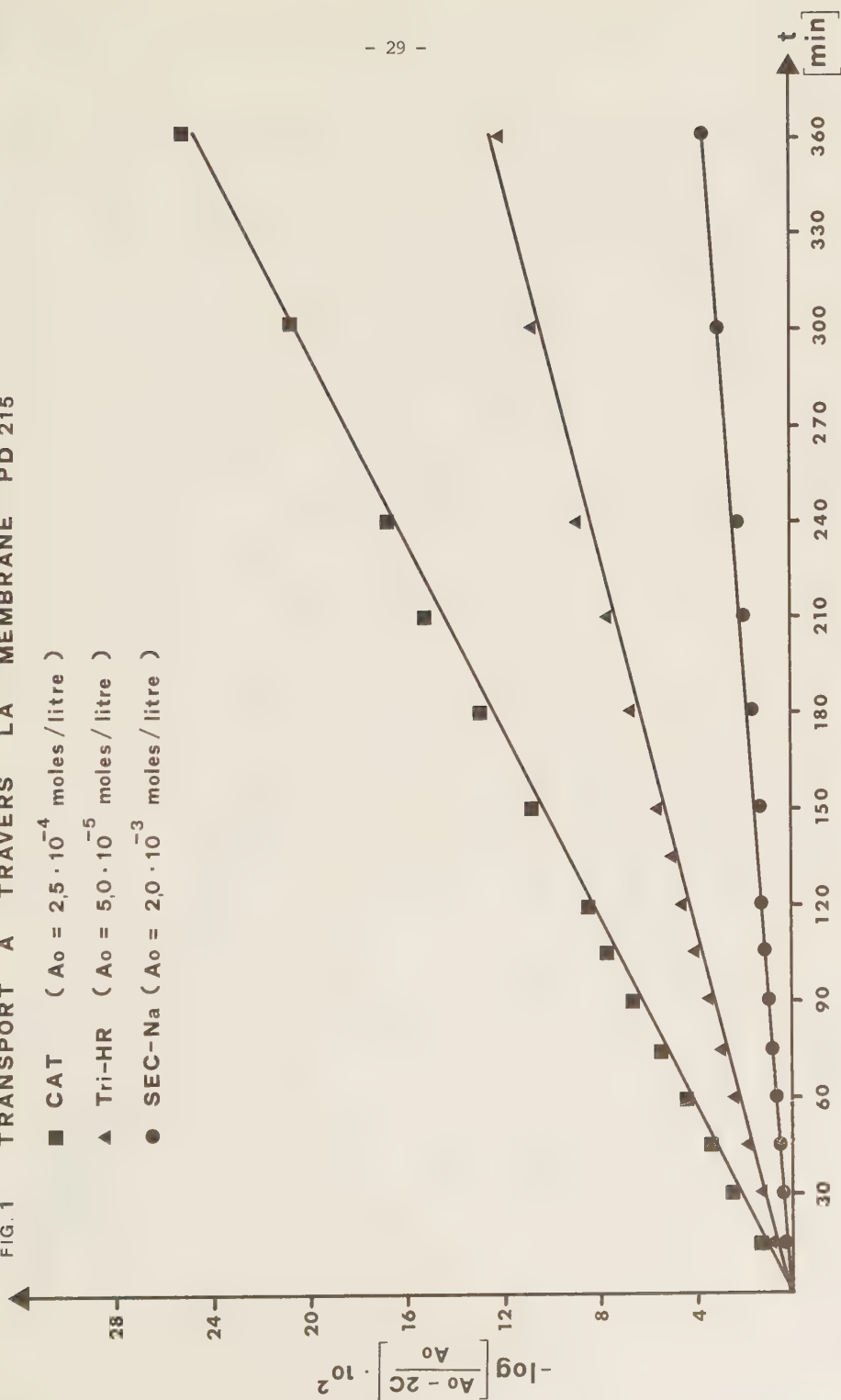
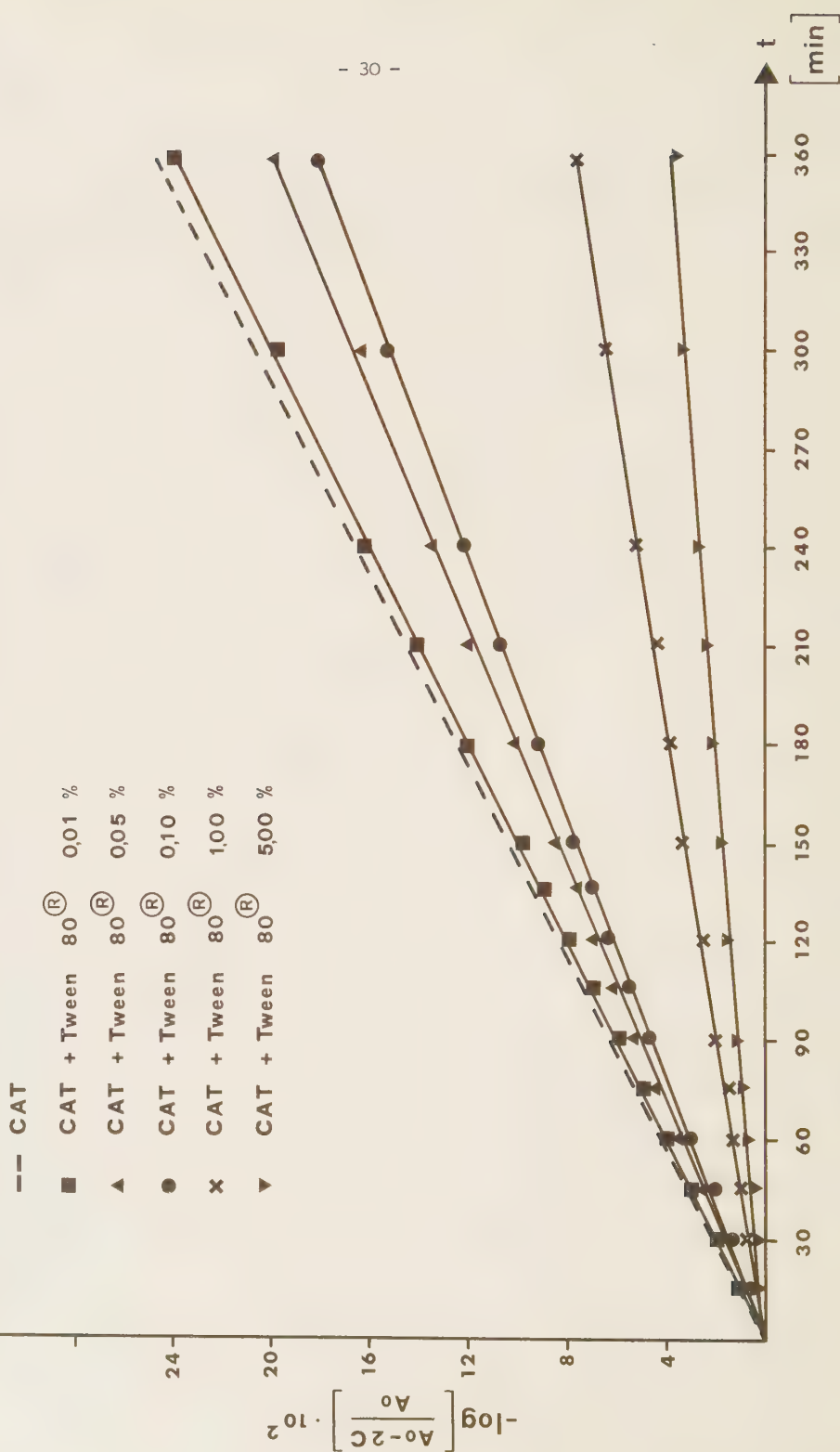


FIG. 2 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

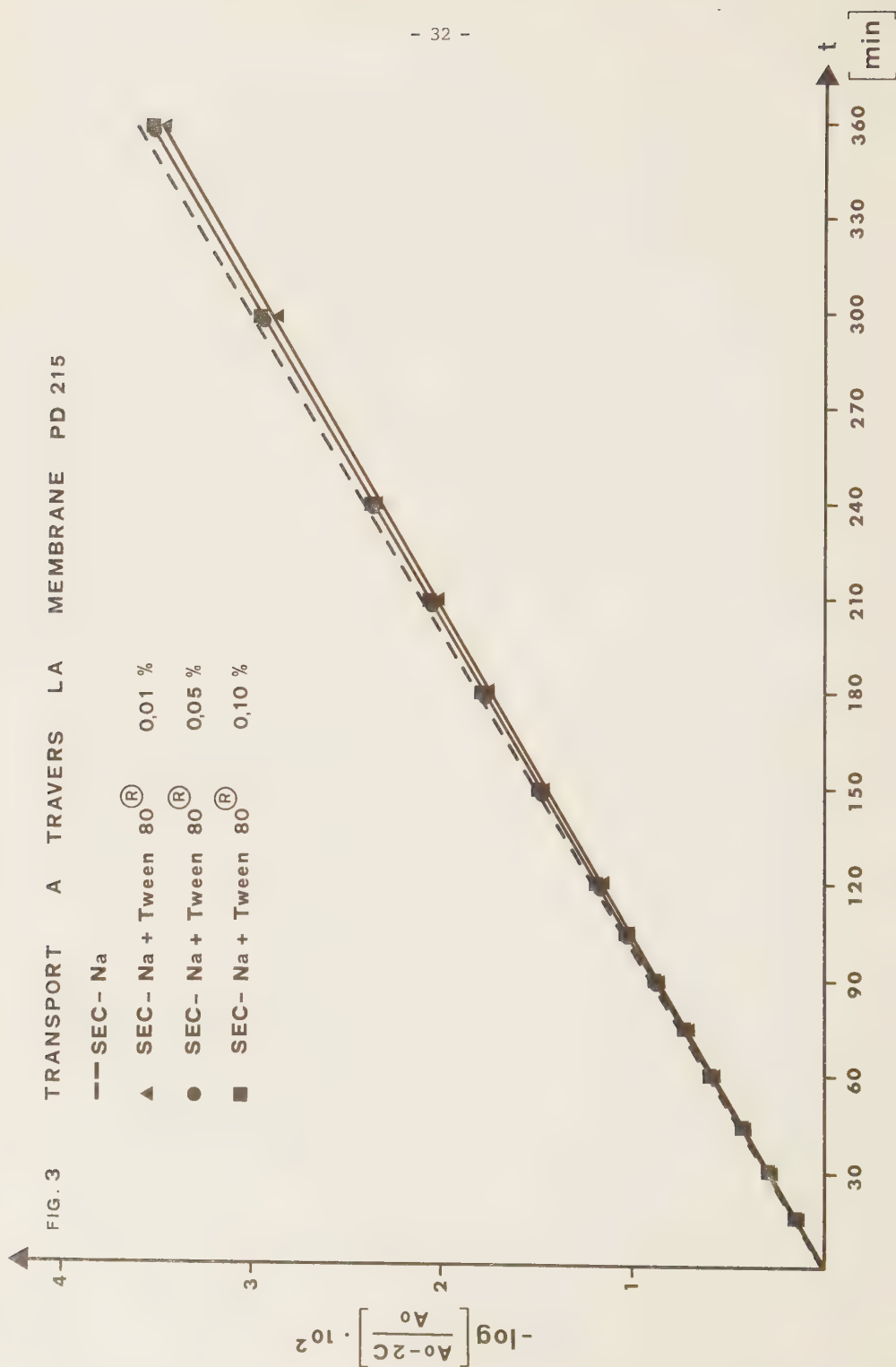


Plusieurs auteurs^{51, 53, 55-61} ont étudié l'interaction possible entre un principe actif et le Tween^R 80. Il a été reconnu que les dérivés phénoliques forment des complexes moléculaires avec l'atome d'oxygène de l'éther des groupements polyoxyéthylènes de la macromolécule. Une liaison pontée d'hydrogène est formée entre l'hydrogène du groupement phénolique et l'atome d'oxygène basique du Tween^R 80. Le mécanisme d'interaction de la CAT et du Tween^R 80 peut également être expliqué soit par une solubilisation micellaire (interaction hydrophobe, forces de Van der Waals), soit par une association intermoléculaire formée par liaison pontée d'hydrogène, qui dépend surtout du pouvoir protonique du dérivé phénolique. Il est possible que les deux mécanismes soient engagés simultanément.

Apparemment, les résultats obtenus avec la CAT sont plutôt en accord avec le concept de partage (éq. 15), indiquant qu'elle est distribuée entre la phase aqueuse et micellaire; les valeurs de R (vitesse de transport en présence de tensio-actifs/ vitesse de transport sans tensio-actifs) diminuent très fortement en fonction de l'augmentation de la concentration en Tween^R 80, surtout pour des concentrations supérieures à la CMC.

SEC-Na (fig. 3, tabl. 4)

Si on compare la valeur de R du SEC-Na dans l'expérience avec 0,1% de Tween^R 80 ($R = 0,99$) à la valeur correspondante de la CAT ($R = 0,73$), il est très vraisemblable que pour cette dernière, la solubilisation micellaire représente le mécanisme principal de l'interaction.



Selon *Ågren et coll.*⁶², le degré de liaison entre un principe actif et une macromolécule est fortement influencé par leurs charges électriques. Cette différence de charges électriques entre SEC-Na et CAT joue également un rôle.

Tri-HR (fig. 4, tabl. 5)

Les valeurs de R proches de l'unité indiquent que le Tween^R 80, dans des concentrations micellaires, n'a aucune influence sur la vitesse de transport de ce dérivé hydrosoluble, ce qui est confirmé par le test de parallélisme.

I.5.3 Influence du laurylsulfate de sodium

La valeur de la CMC a été rapportée par *Suzuki et coll.*⁶³ et aurait une valeur approximative de 8mM (0,23%).

CAT (fig. 5, tabl. 3)

Le transport de la CAT, avec une concentration en laurylsulfate de sodium inférieure à la CMC, est légèrement freiné, ce qui pourrait expliquer une interaction entre la CAT et les monomères, diminuant la mobilité par augmentation de la dimension du composé formé. Aux concentrations micellaires, une fraction de la CAT est incluse dans la micelle, réduisant ainsi la disponibilité de transfert.

SEC-Na (fig. 6, tabl. 4)

Le coefficient de perméabilité apparent augmente significativement (probabilité 0,05) en fonction de l'augmentation de la concentration de ce tensio-actif anionique. Ce résultat est en désaccord avec le concept de solubilisation micellaire.

FIG. 4

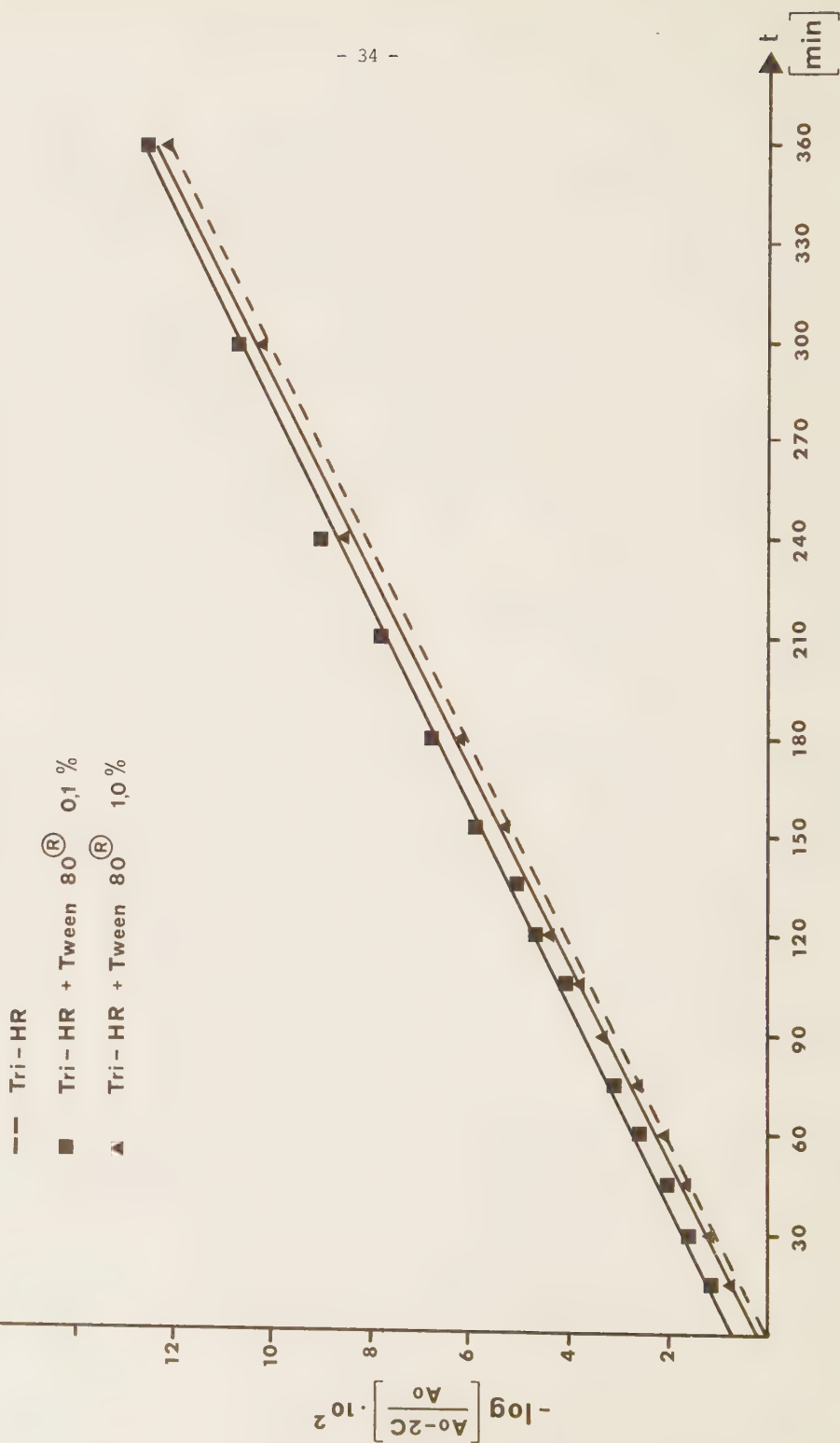


FIG. 5 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

--CAT

■ CAT + laurylsulfate - Na 0,10 %

▲ CAT + laurylsulfate - Na 0,20 %

● CAT + laurylsulfate - Na 0,50 %

$$-\log \left[\frac{A_0}{A_0 - 2C} \right] \cdot 10^2$$

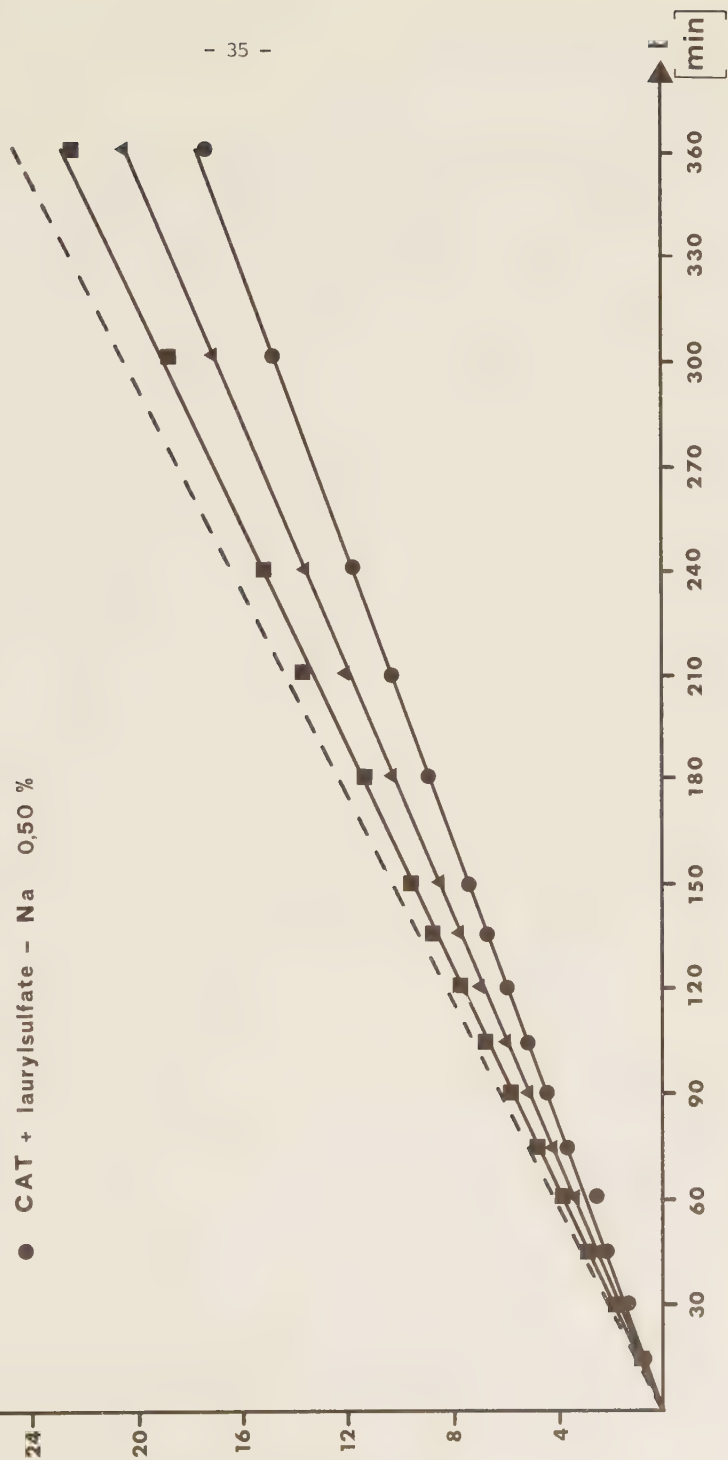
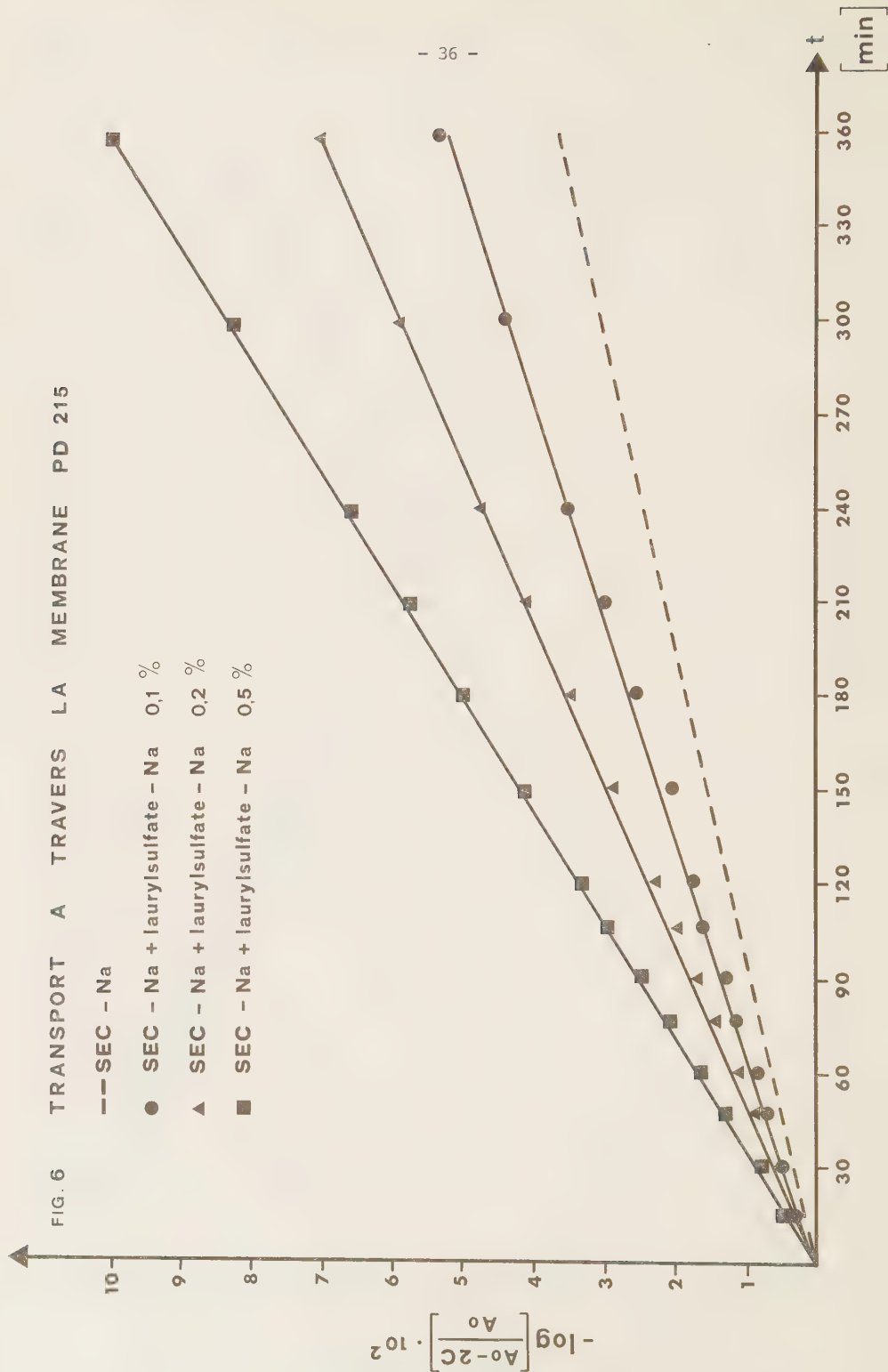


FIG. 6 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215



Le laurylsulfate de sodium et le SEC-Na possèdent respectivement un groupement sulfate et sulfonate fortement polaire. Une solubilisation micellaire exigerait une interaction du principe actif anionique avec le tensio-actif anionique. Un tel fait est peu probable, parce qu'il est en opposition avec la théorie des forces répulsives de Coulomb⁶⁴.

On peut admettre que le sodium passe la membrane très rapidement et provoque des répulsions électriques des deux anions dans le compartiment A, facilitant ainsi le passage du principe actif diffusible (SEC⁻).

L'explication de l'effet DONNAN est mentionnée au chapitre I.5.6.

Tri-HR (fig. 7, tabl. 5)

L'influence du laurylsulfate de sodium sur le transport du Tri-HR est interprétable par une formation de complexe insoluble et d'un effet micellaire. Il semble que le laurylsulfate de sodium forme un complexe insoluble avec le Tri-HR au-dessous de la CMC et des agrégats micellaires solubles au-dessus.

Des solutions de Tri-HR dans 0,5% de laurylsulfate de sodium (concentration supérieure à la CMC) sont limpides, mais la disponibilité du principe actif est réduite, indiquant que la plus grande partie est incorporée dans les micelles.

Des solutions de Tri-HR dans 0,1 et 0,2% de ce tensio-actif (concentrations inférieures à la CMC) sont légèrement troubles et le degré de turbidité dépend de la concentration en tensio-actif. Si on chauffe la solution colloïdale à 30° C, elle devient limpide. Se basant sur ces observations de concentration et de

FIG. 7 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

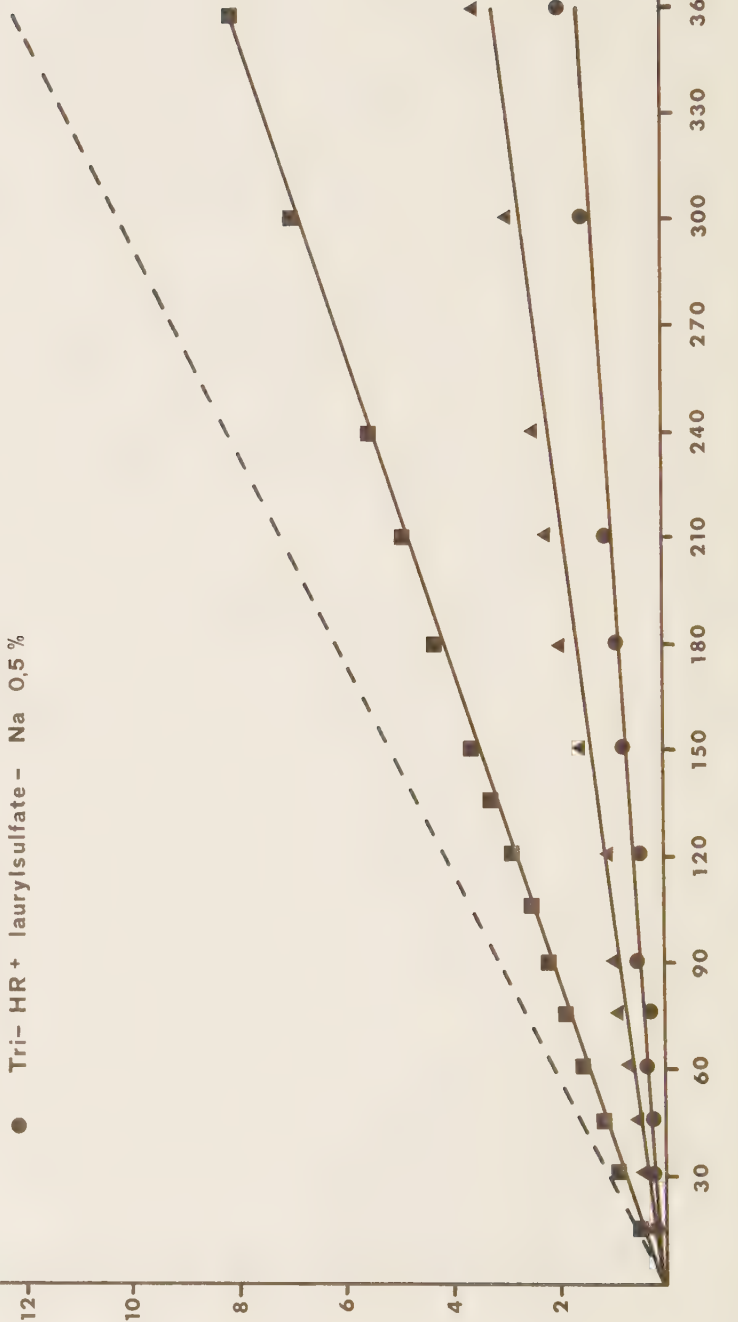
-- Tri-HR

■ Tri-HR + laurylsulfate - Na 0,1 %

▲ Tri-HR + laurylsulfate - Na 0,2 %

● Tri-HR + laurylsulfate - Na 0,5 %

$$-\log \left[\frac{A_0 - 2C}{A_0} \right] \cdot 10^2$$



température, on peut supposer que le trouble indique une formation de complexe peu soluble entre le Tri-HR et le tensio-actif et que le pourcentage du principe actif complexé augmente avec la concentration en laurylsulfate.

I.5.4 Influence du dioctyl sulfosuccinate de sodium

*Lish*⁶⁵ a montré que des solutions de Tyrode, en présence de laurylsulfate ou de dioctyl sulfosuccinate de sodium provoquent le même abaissement de la tension superficielle (à 38° C, tensiomètre de Lecomte du Noüy). On peut en déduire que la CMC du dioctyl sulfosuccinate devrait être voisine de celle du laurylsulfate.

Des concentrations micellaires ont des effets retardateurs pour la CAT (fig. 8, tabl. 3), le Tri-HR (fig. 9, tabl. 5) et des effets accélérateurs pour le SEC-Na (fig. 10, tabl. 4). Les interprétations du chapitre I.5.3 sont également valables pour ce tensio-actif anionique.

I.5.5 Influence du taurocholate de sodium

La valeur de la CMC du taurocholate de sodium a été rapportée par *Dietschy et coll.*⁶⁶ et a un ordre de grandeur de 5 mM (0,27%, dans une solution isoosmotique d'électrolytes). On a volontairement négligé la faible modification de la concentration en taurocholate dans le compartiment A en fonction du temps; en effet, 0,04% seulement de la concentration initiale (1%) a été transféré dans une période de 6 h.

FIG. 8 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

-- CAT

- CAT + dioctyl sulfosuccinate - Na 0,25 %
- ▲ CAT + dioctyl sulfosuccinate - Na 0,50 %
- CAT + dioctyl sulfosuccinate - Na 1,00 %

$$-\log \left[\frac{A_0 - 2C}{A_0} \right] \cdot 10^2$$

t [min]

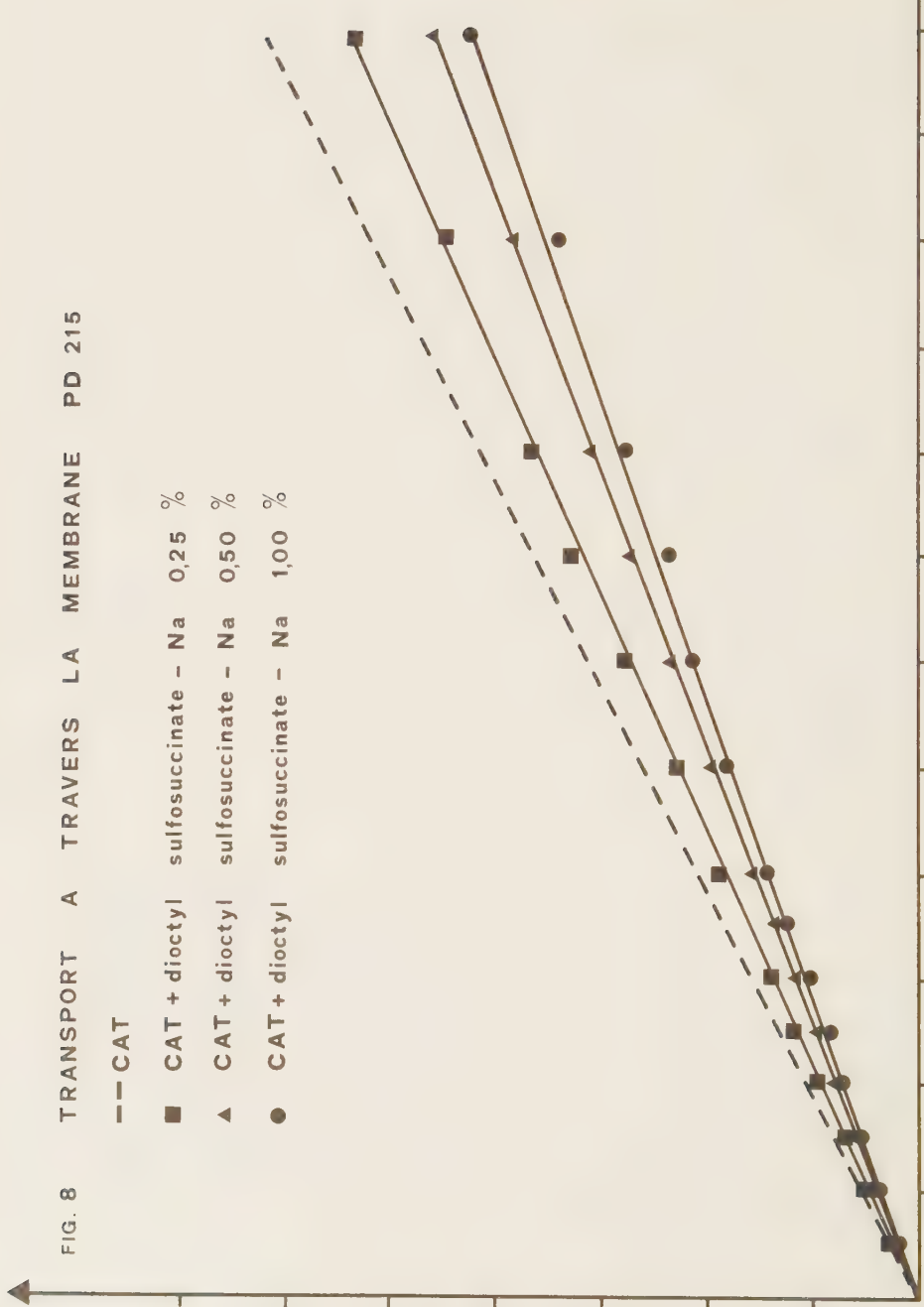


FIG. 9

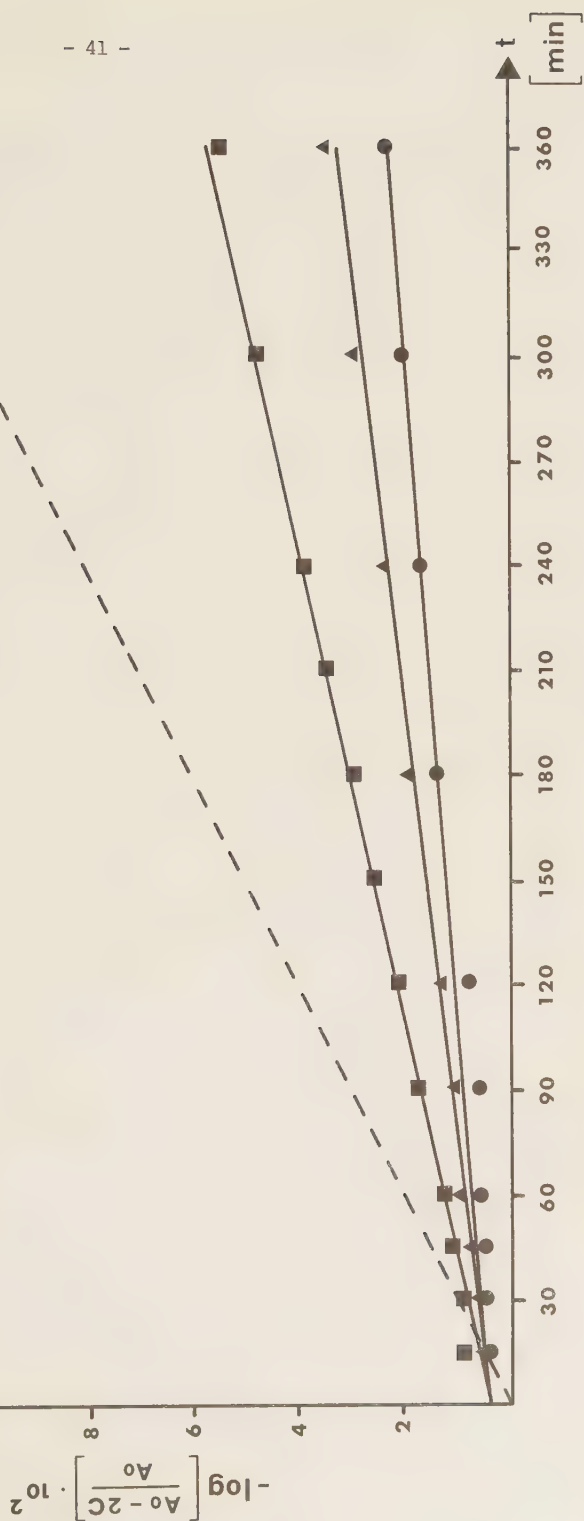
TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

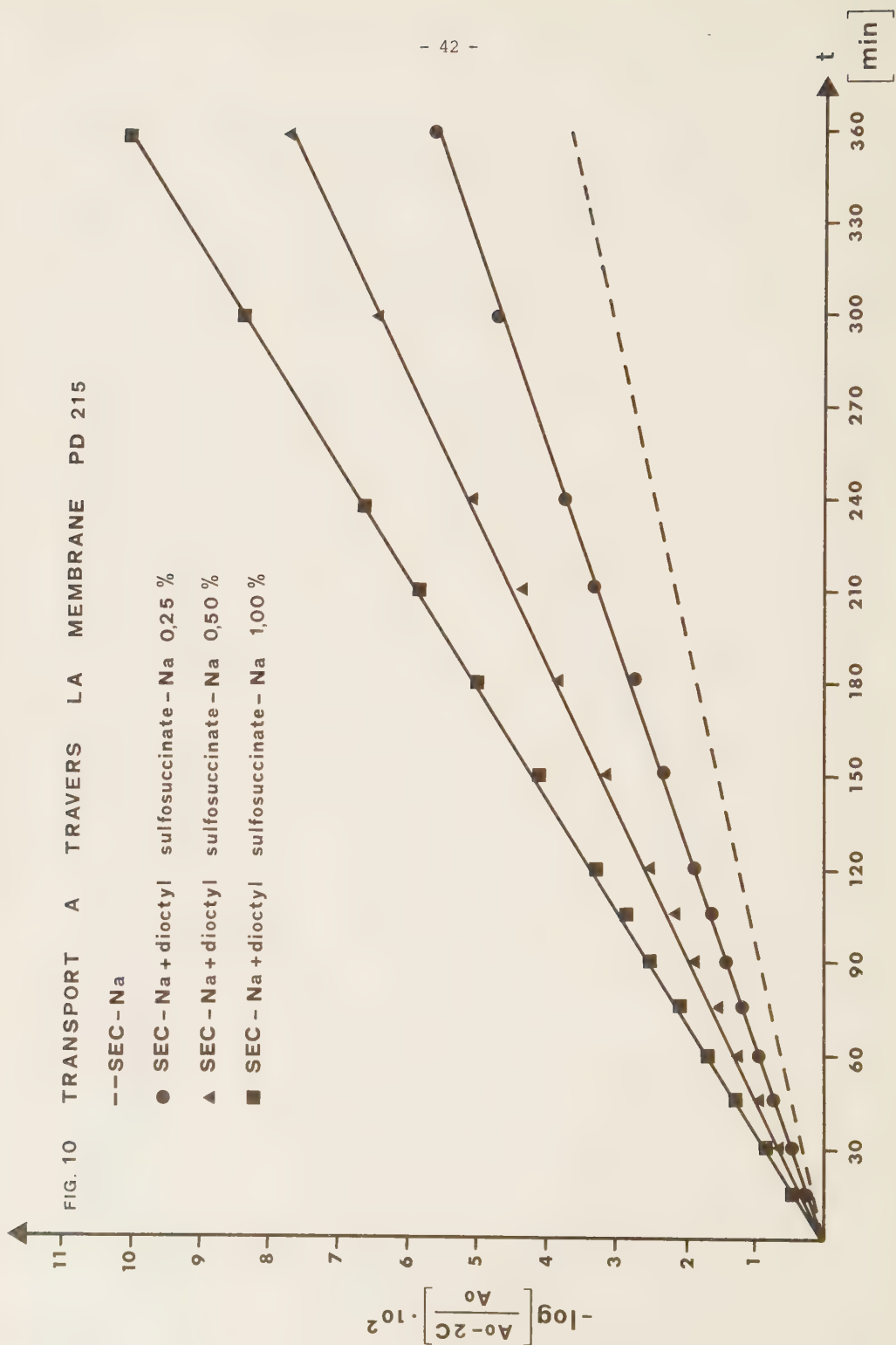
-- Tri-HR

■ Tri-HR + dioctyl sulfosuccinate - Na 0,25 %

▲ Tri-HR + dioctyl sulfosuccinate - Na 0,50 %

● Tri-HR + dioctyl sulfosuccinate - Na 1,00 %





CAT (fig. 11, tabl. 3)

En exprimant graphiquement, selon l'équation (7), les valeurs obtenues, on a constaté un changement de la pente en fonction du temps aux concentrations micellaires de taurocholate : le transport, dans ce cas, ne suit pas une cinétique de premier ordre et l'équation (7) n'est pas valable.

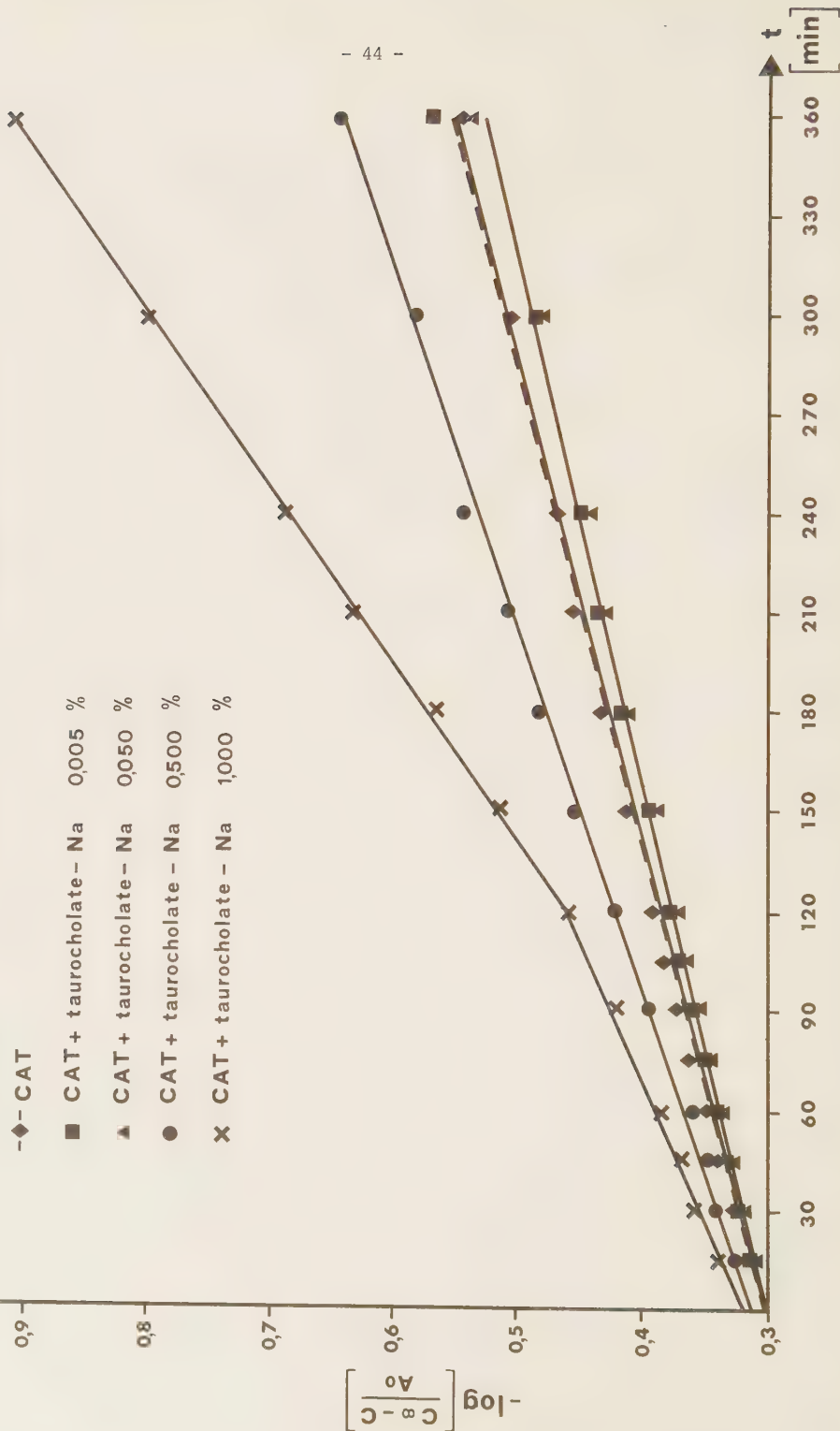
En remplaçant l'expression $\log [A_o - 2C/A_o]$ par $\log [C_\infty - C/A_o]$, où C_∞ est la concentration à l'équilibre dans le compartiment C, on introduit une autre constante⁶⁷. Cette correction permet néanmoins de diviser la courbe en deux droites et de calculer la vitesse de transport dans la période initiale (0 - 2 h) et dans la période suivante (2 - 6 h).

Une concentration inférieure à la CMC ne modifie pas significativement la vitesse de transport; par contre, des concentrations micellaires augmentent de manière significative le coefficient de perméabilité apparent, ce qui implique que la disponibilité de la CAT n'est pas réduite par le concept de partage. Une concentration de taurocholate de 1% permet d'observer un phénomène biphasique du transport. Une période initiale précède une seconde période où la vitesse de transport augmente.

Le mécanisme de l'augmentation de la vitesse de transport en présence de concentrations micellaires en taurocholate n'a pas été élucidé. Il n'est pas établi si ces effets sont dus à une interaction principe actif-taurocholate ou à des effets sur la membrane. Le taurocholate sodique est un dérivé d'un acide fort de $pK_a = 1,5$. On en déduit que ce tensio-actif physiologique existe,

FIG. 11

TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215



dans nos conditions expérimentales, exclusivement sous forme ionisée et que chaque ion de taurocholate est entouré d'un champ électrostatique capable de provoquer un changement du gradient électrique de la membrane.

SEC-Na (fig. 12, tabl. 4)

Le taurocholate de sodium, à des concentrations de 0,5 et 1,0%, augmente également le passage du SEC-Na, indiquant qu'une solubilisation micellaire n'est pas réalisée ou que la stabilité du complexe formé est minime. Ce résultat peut être interprété de la même manière que pour SEC-Na en présence de laurylsulfate de sodium, c'est-à-dire par l'effet de DONNAN.

Tri-HR

Pour le Tri-HR, la méthode de dosage direct en UV n'étant pas utilisable en raison des interférences d'absorption, nous n'avons pas poursuivi les essais avec ce dérivé.

I.5.6 Influence de la carboxyméthylcellulose sodique (= CMC-Na)

CAT et Tri-HR (fig. 13 et 14, tabl. 3 et 5)

La présence de macromolécules de CMC-Na provoque un abaissement significatif de la vitesse de transport de ces deux dérivés dans toutes les concentrations utilisées. Cet effet freinateur peut être attribué à une augmentation de la viscosité, à une interaction de la CMC-Na avec le principe actif ou à une modification de la perméabilité au niveau de la membrane. Seule une étude complémentaire qui ne nous a pas paru justifiée, puisque nous avons obtenu un effet négatif, permettrait d'élucider le mécanisme de ce phénomène.

FIG. 12 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

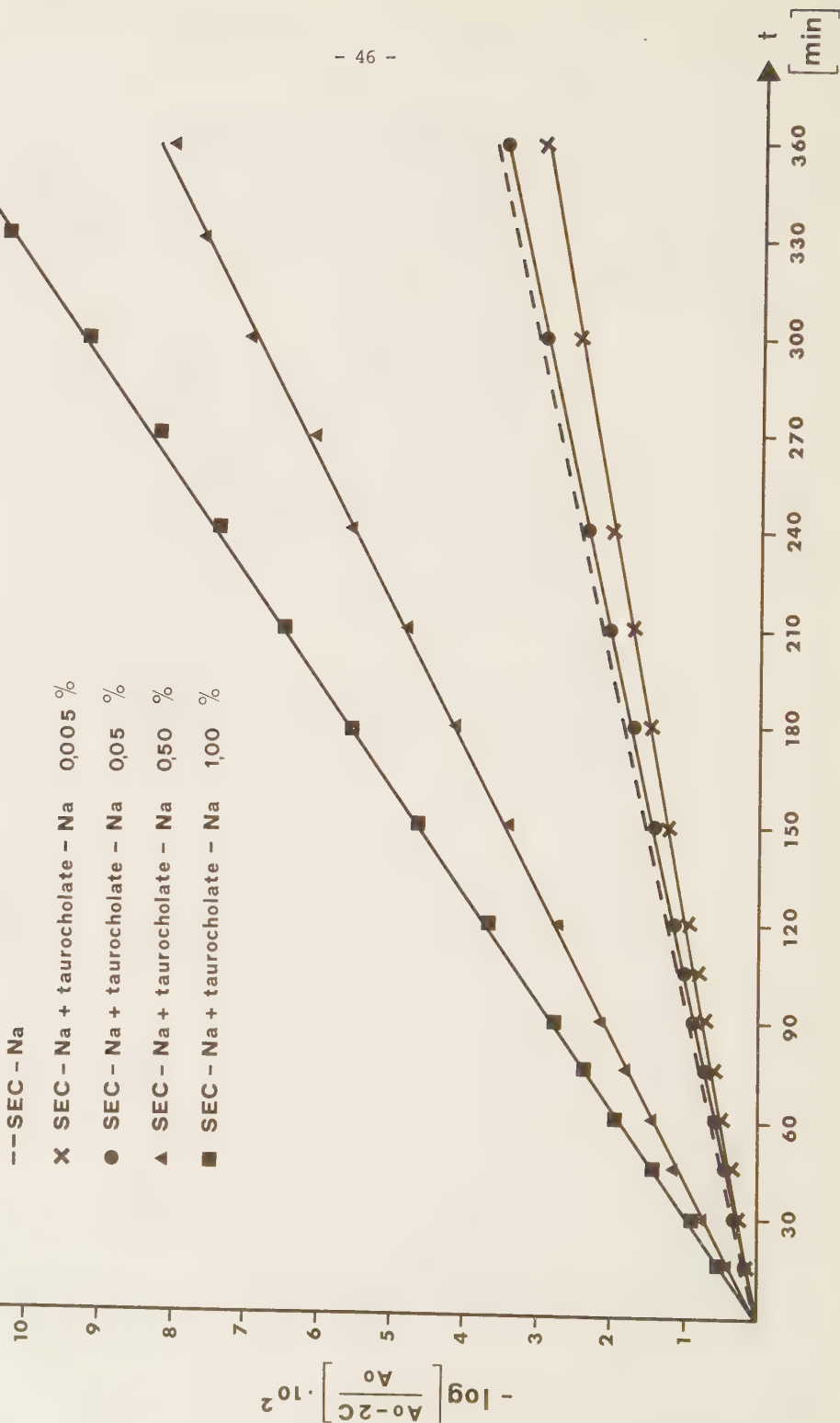


FIG. 13

-- CAT

■ CAT + CMC-Na 0,10 %

▲ CAT + CMC-Na 0,20 %

● CAT + CMC-Na 0,50 %

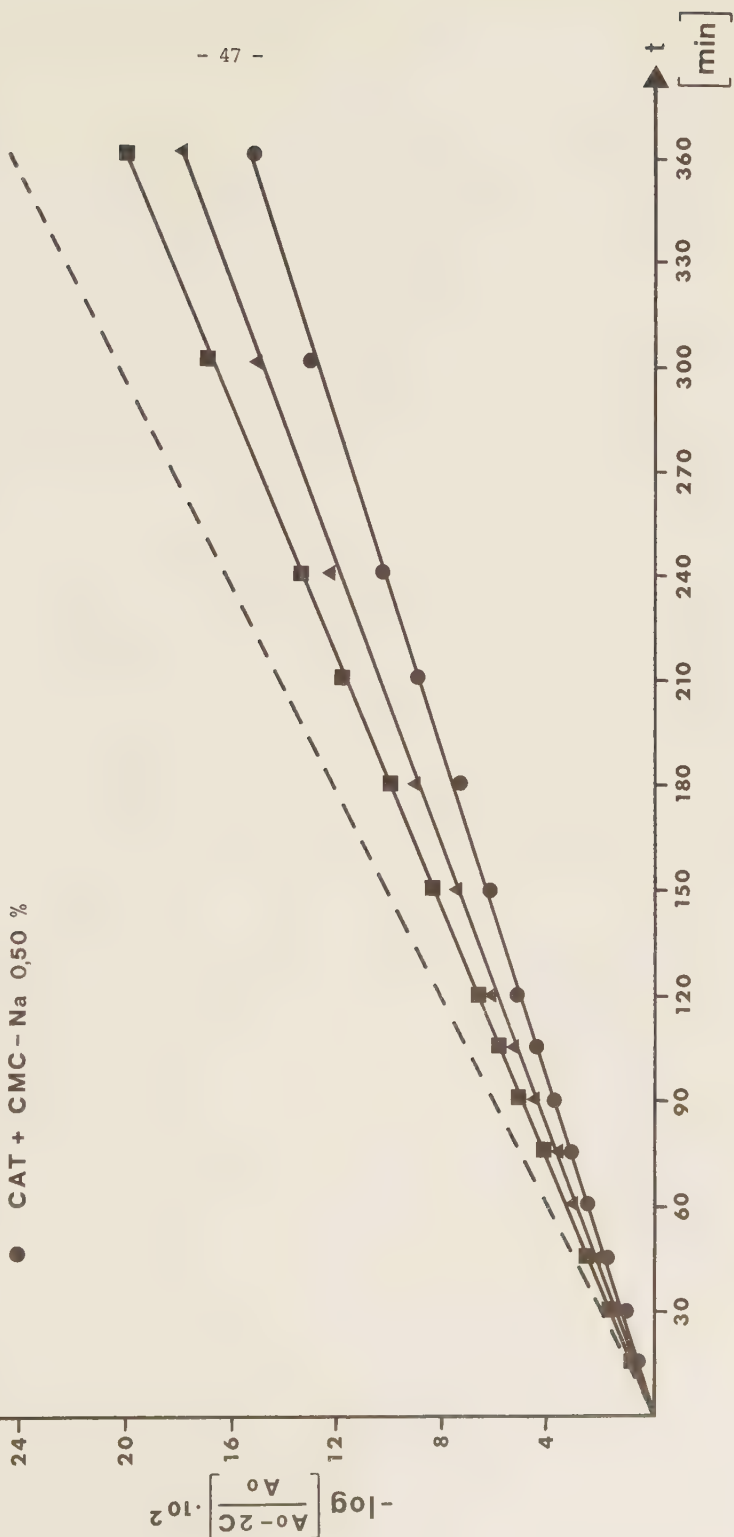
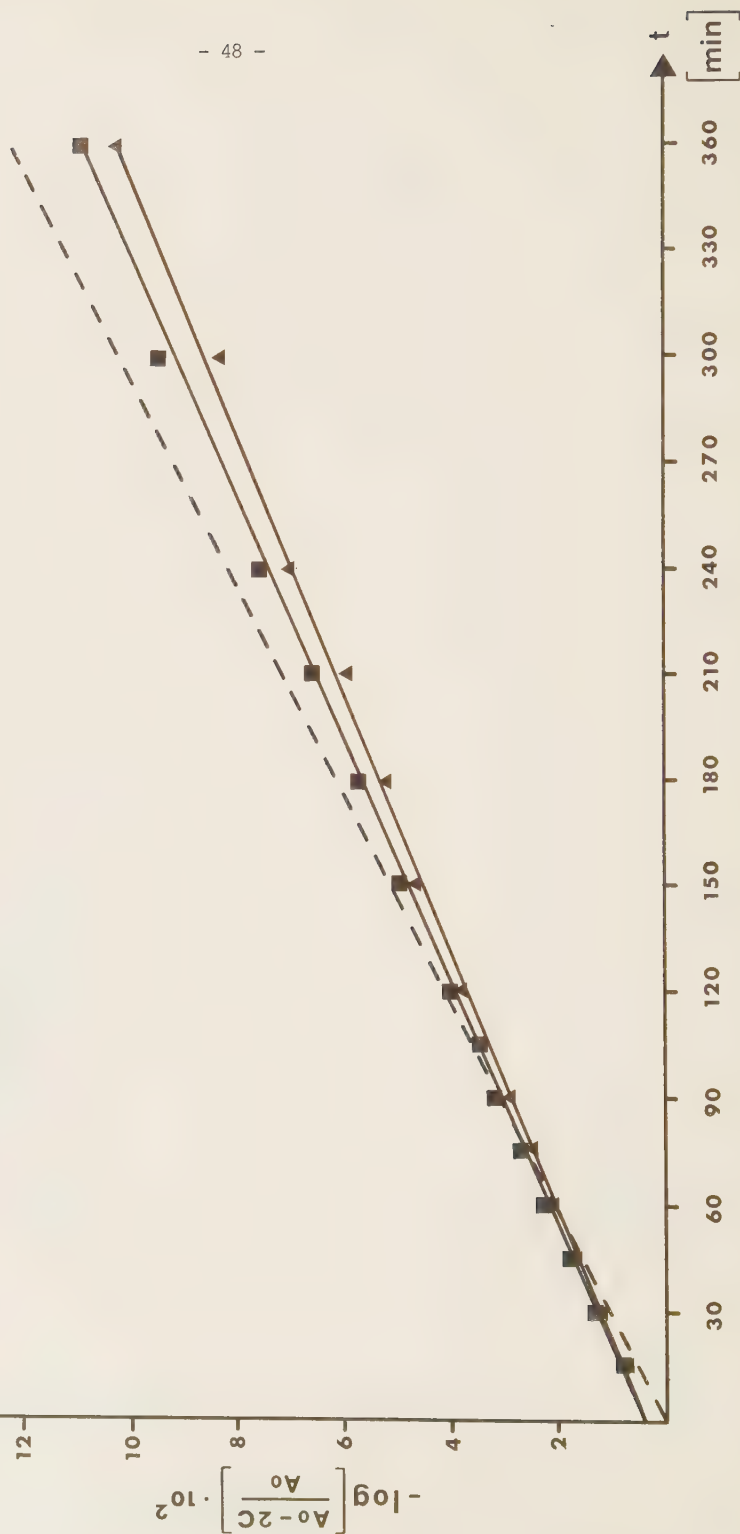


FIG. 14 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

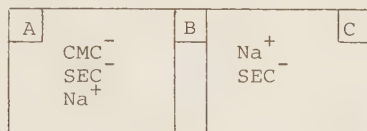
--- Tri-HR
 ■ Tri-HR + CMC - Na 0,50 %
 ▲ Tri-HR + CMC - Na 1,00 %



SEC-Na (fig. 15, tabl. 4)

L'adjonction de la CMC-Na accélère le transport du SEC-Na d'une manière très fortement significative, permettant ainsi de différencier la mobilité de la CAT et du SEC-Na en présence de polyélectrolytes chargés. Ce phénomène est explicable par la théorie de l'équilibre de DONNAN^{9, 62, 68, 69}.

Le système à l'équilibre peut être caractérisé par le diagramme suivant :



où : CMC^- = macromolécules dissociées, non diffusibles

SEC^- = anions diffusibles de SEC-Na

Na^+ = ions sodium

D'après *Higuchi* et *Kuramoto*⁹, qui ont fait des constatations semblables mais dans d'autres conditions d'expérience, la distribution inégale des anions du SEC-Na à travers la membrane semi-perméable est donnée par :

$$\frac{\text{SEC}^-_C}{\text{SEC}^-_A} = \sqrt{1 + \frac{\text{CMC}^-_A}{\text{SEC}^-_A}} \quad (18)$$

SEC^-_A = concentration des anions diffusibles dans le compartiment A [moles/litre]

SEC^-_C = concentration des anions diffusibles dans le compartiment C [moles/litre]

CMC^-_A = concentration du polyélectrolyte dissocié non diffusible [équivalent-grammes/litre]

L'équation (18) exprime le rapport des concentrations des anions diffusibles du compartiment A et du compartiment C à l'équilibre.

Un polyélectrolyte non diffusible et chargé négativement, influence le rapport de la concentration à l'équilibre des anions diffusibles. Le polyélectrolyte est susceptible de chasser l'ion de même signe à travers la membrane semi-perméable, augmentant ainsi la diffusion du principe actif en direction du compartiment C. L'effet de DONNAN est important si la concentration en SEC-Na est faible et la concentration en polyélectrolyte ($CMC-Na$) élevée.

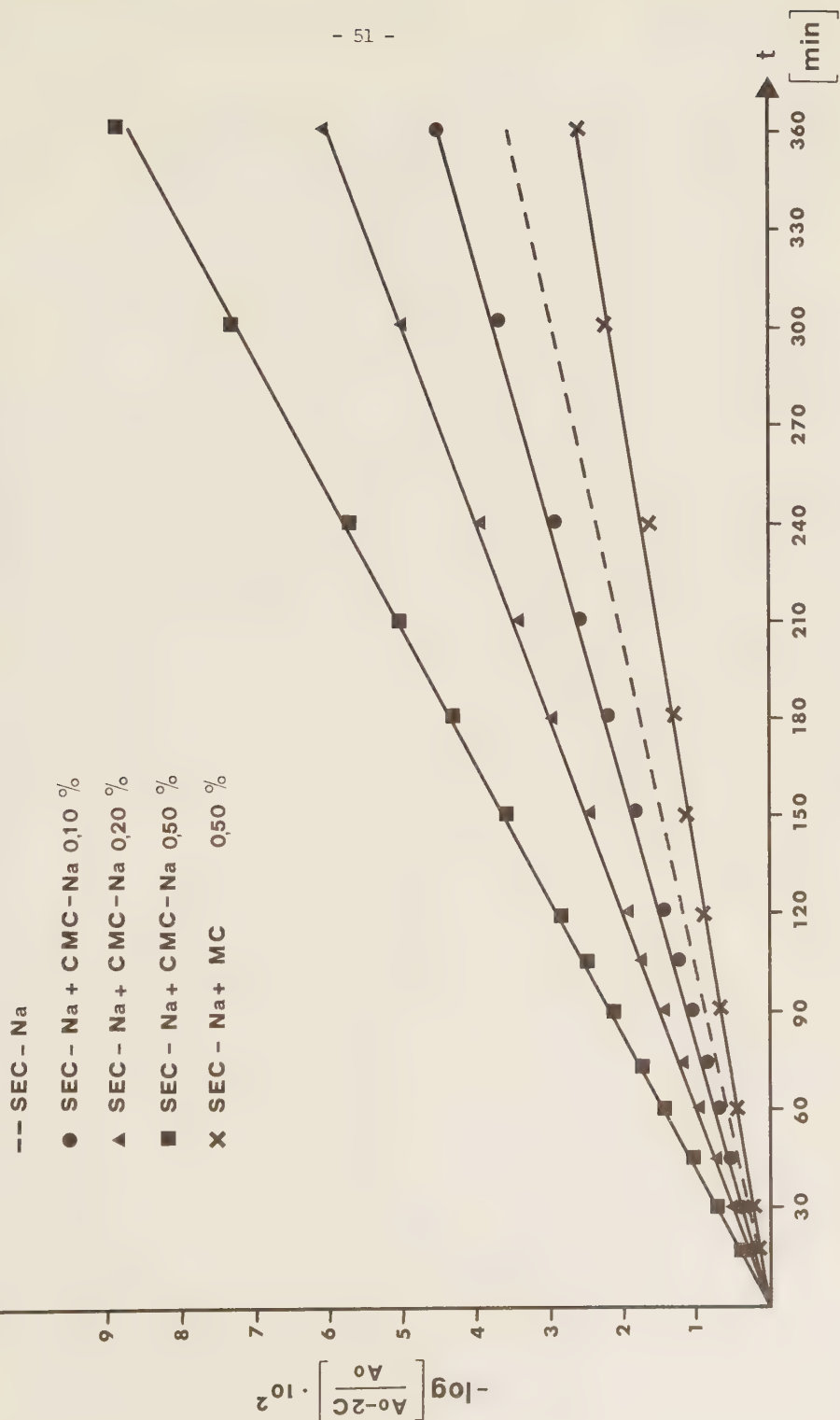
Si l'on s'intéresse moins aux situations d'équilibre, mais plutôt aux aspects cinétiques, c'est-à-dire à la vitesse de transport à travers la membrane semi-perméable, on peut calculer le rapport R^g :

$$R = \frac{\text{Vitesse de transport en présence de } CMC-Na}{\text{Vitesse de transport sans } CMC-Na} = \sqrt{1 + \frac{(CMC^-)_A}{(SEC^-_{t=0})_A}} \quad (19)$$

$(CMC^-)_A$ = concentration du polyélectrolyte dissocié, non diffusible dans le compartiment A [équivalent-grammes/litre]

$(SEC^-_{t=0})_A$ = concentration initiale de l'anion diffusible dans le compartiment A [moles/litre]

FIG. 15 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215



Les valeurs croissantes de R dans le tableau 4 mettent en évidence l'influence de l'augmentation de la concentration de la CMC-Na, selon l'équation (19).

A titre comparatif, la présence de méthylcellulose dans la solution de SEC-Na, donne un rapport R inférieur à l'unité, indiquant une disponibilité réduite.

I.5.7 Influence du Carbopol 941^R (fig. 16 à 18, tabl. 3 à 5)

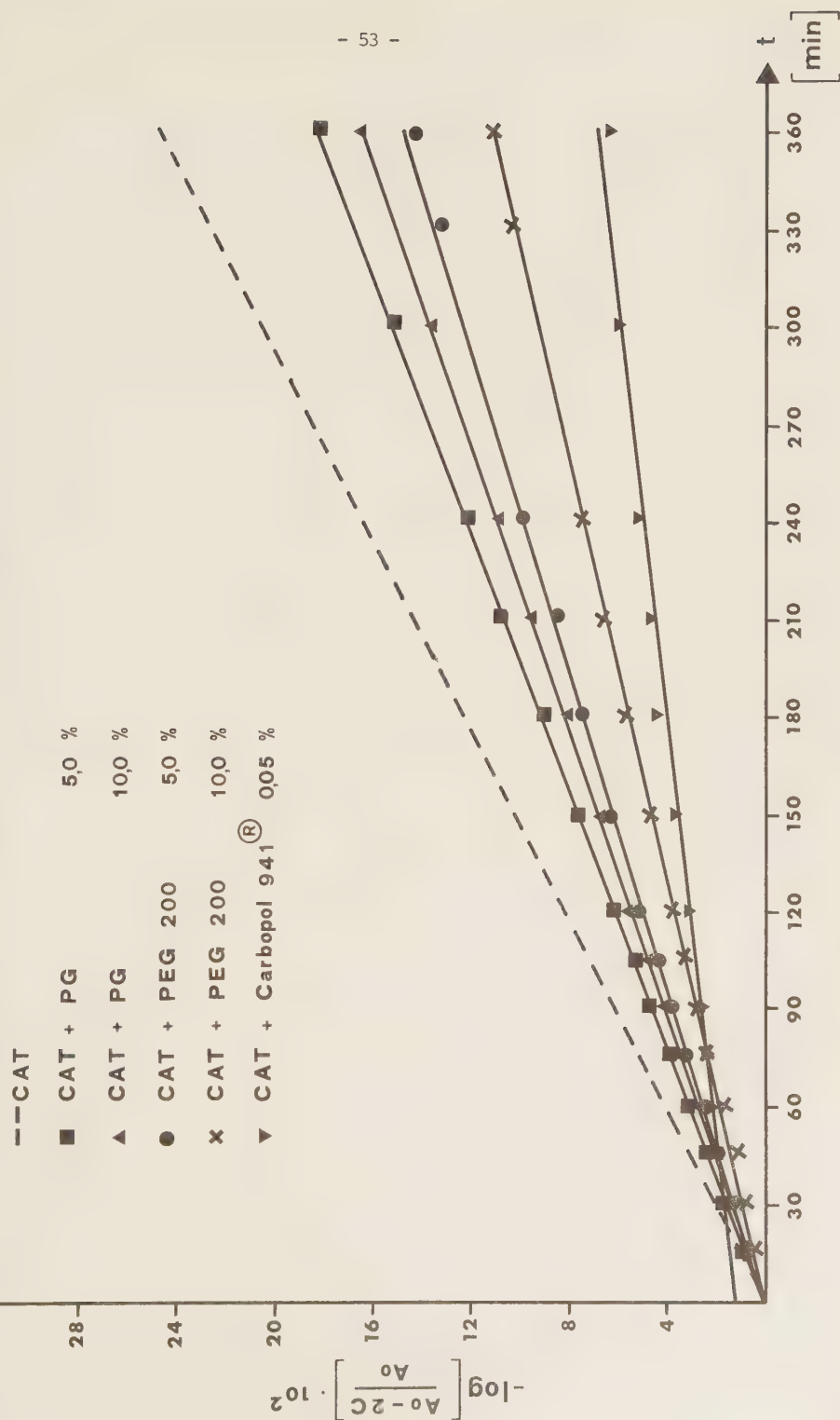
Les coefficients de perméabilité apparents des trois flavonoïdes sont abaissés en présence de cet agent viscosifiant. La vitesse de transport du SEC-Na en présence de Carbopol 941^R, polyélectrolyte non diffusible comme la CMC-Na, ne suit pas la théorie de DONNAN. En effet, ce polyélectrolyte, préalablement neutralisé, est dissocié dans une proportion différente (14% pour le Carbopol 941^R ⁶⁹ et 60% pour la CMC-Na ⁶⁸). L'augmentation de la viscosité, dans ce cas, permet d'expliquer l'abaissement du coefficient de perméabilité.

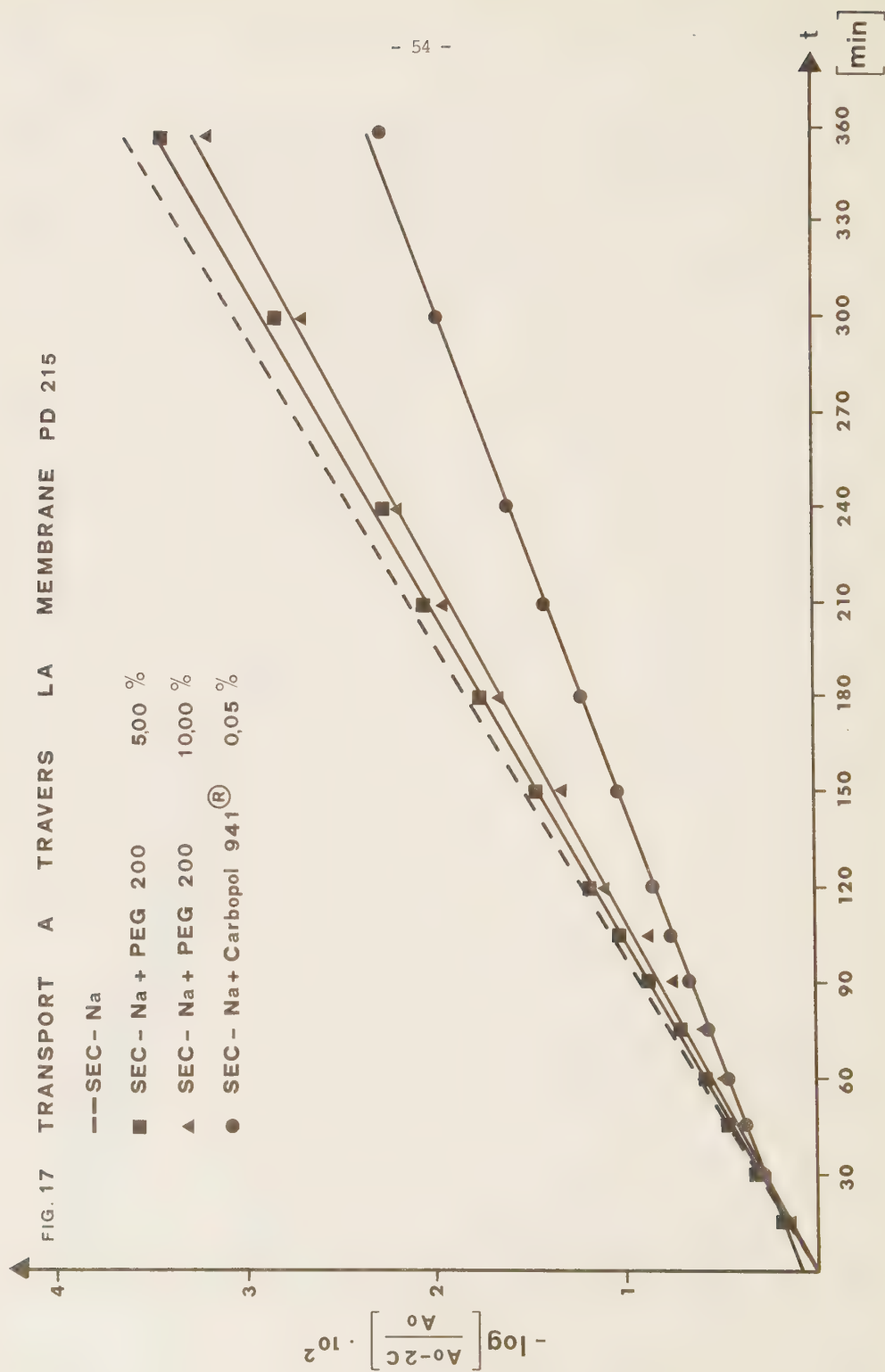
I.5.8 Influence du Polyéthylèneglycol 200 (= PEG 200)

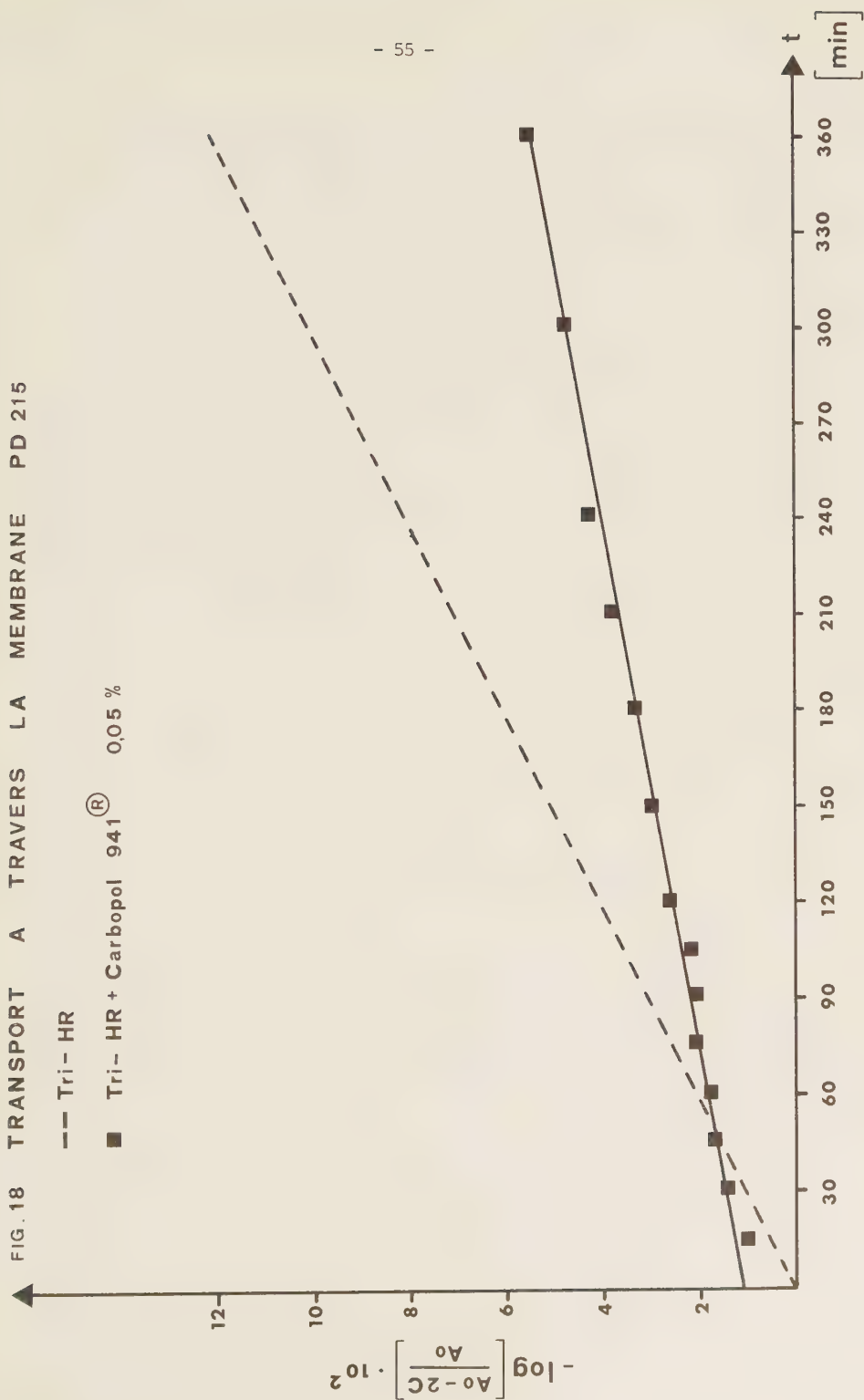
CAT (fig. 16, tabl. 3)

Les valeurs de R sont toutes inférieures à l'unité, mais plus élevées que celles obtenues au cours de l'expérience avec le Tween^R 80 (la CAT, en présence de Tween^R 80 à 5%, a une valeur de R de 0,13, alors que celle obtenue avec le PEG 200 à 5% est de 0,75). Selon Ågren et Elofsson⁴⁸, une macromolécule possède plusieurs sites de réaction, rendant possible une liaison avec une petite molécule. Ceci explique que la macromolécule,

FIG. 16 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215







avec un nombre de groupements oxyéthylène plus élevé par mole (Tween^R 80 : 20), fixe davantage de principe actif que celle qui en a moins (PEG 200 : 4). Si l'on admettait que l'association intermoléculaire soit le facteur prédominant et que seul le principe actif à l'état "libre" puisse traverser la barrière, les valeurs de R devraient alors être plus petites pour le transport en présence de PEG 200 et plus élevées pour le Tween^R 80 (en tenant compte des poids moléculaires approximatifs de chacun de ces adjuvants). En réalité, ce n'est pas le cas, puisque le Tween^R 80 forme des micelles qui emprisonnent une certaine quantité de principe actif, réduisant ainsi le passage par diminution de la concentration en principe actif "libre".

Le rapport R est défini par⁴⁸ :

$$R = \frac{\text{Vitesse de transport en présence de PEG}}{\text{Vitesse de transport en absence de PEG}} = \frac{(A)}{(SA)} \quad (20)$$

où : (A) = concentration du principe actif libre

(SA) = concentration stoechiométrique du principe actif

Si A est une molécule de principe actif et B la macromolécule, on peut alors admettre que les complexes ont la forme AnB, par conséquent la concentration stoechiométrique (SA) correspond à :

$$(SA) = (A) + n (AnB)$$

L'équation (20) montre que si (A) est très grand par rapport à la quantité totale liée du principe actif, R est voisin de l'unité; par contre, si la quantité totale liée à la macromolécule est importante, le rapport se rapproche alors de zéro.

SEC-Na (fig. 17, tabl. 4)

Les coefficients de perméabilité apparents diminuent légèrement en présence de PEG, réduisant la diffusibilité du SEC-Na. En doublant la concentration en macromolécules, la vitesse de transport ne change que peu significativement, ce qui permet d'affirmer que la viscosité ne joue pas de rôle important.

Tri-HR (fig. 19, tabl. 5)

Le PEG diminue également la perméabilité de ce dérivé, mais d'une manière plus significative que celle du SEC-Na.

L'abaissement du coefficient de perméabilité apparent n'est pas proportionnel à la concentration en PEG 200.

I.5.9 Influence du pH

CAT dans pH = 2,0 (fig. 20, tabl. 3)

Une solution tampon de pH 2,0 diminue la vitesse de transport. Ce résultat, à première vue aberrant, confirme la théorie de Hathway et Seakins³⁶, selon laquelle la CAT, dans une solution acide, a la propriété de former des produits de polymérisation; pour cette raison, le passage de ces polymères (ou oligomères) à travers une membrane de cellophane est freiné par divers facteurs, tels que l'augmentation de la dimension de ces molécules, le changement de la solubilité, etc.

FIG. 19 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

-- Tri-HR

■ Tri-HR + PEG 200 5,0 %

▲ Tri-HR + PEG 200 10,0 %

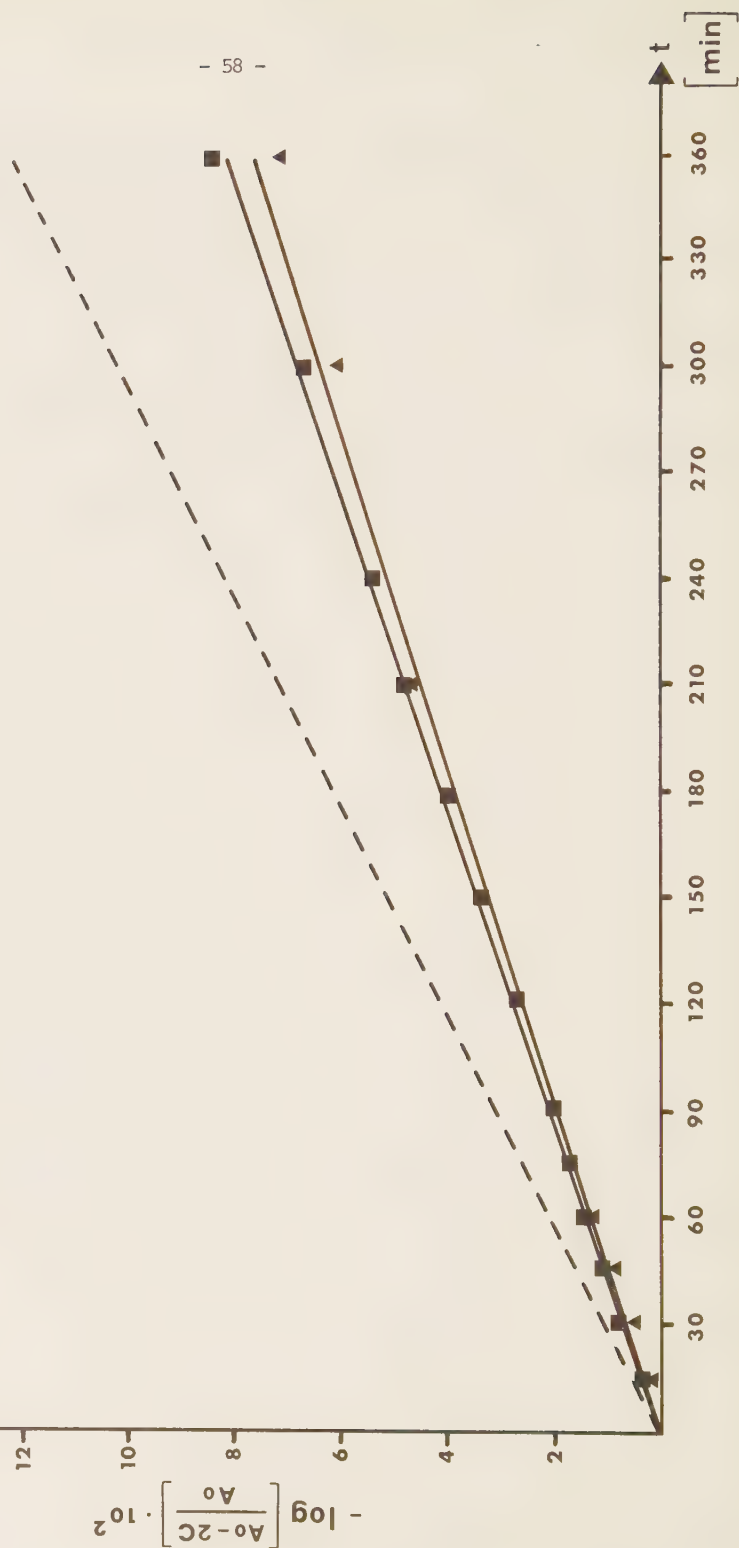
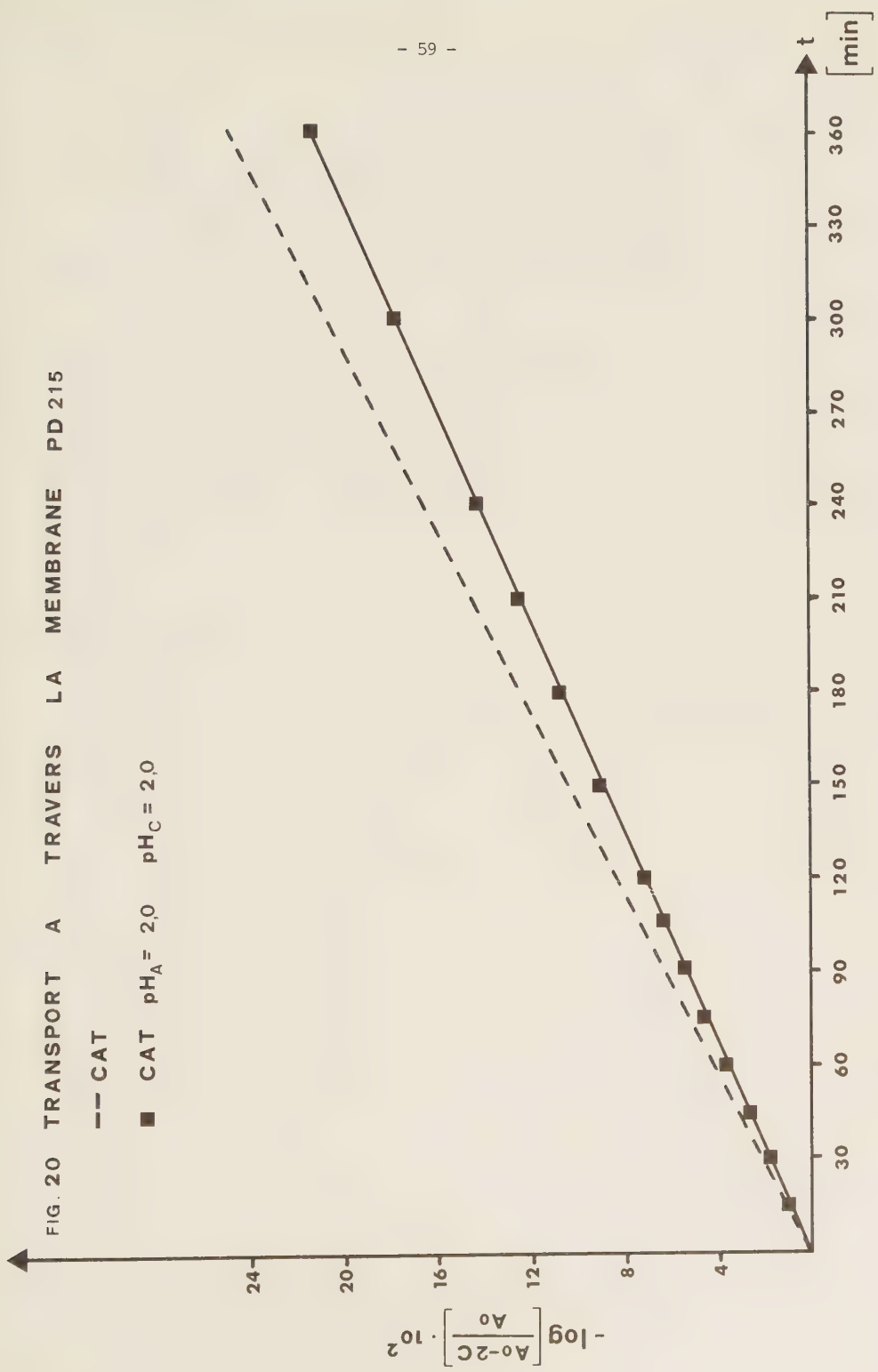


FIG. 20 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

-- CAT

■ CAT $pH_A = 2,0$ $pH_C = 2,0$



SEC-Na dans pH = 2,2 (fig. 21, tabl. 4)

La vitesse de transport d'un dérivé ionisé tel que le SEC-Na, dans une solution tampon de pH 2,2, est augmentée selon un facteur voisin de 4 par rapport à la solution de référence non tamponnée.

Le coefficient de perméabilité, plus élevé dans un pH de 2,2, s'explique par une diminution du degré d'interaction avec le solvant, la quantité d'un complexe ion-dipôle dépendant de la fraction des molécules ionisées, réduite à ce pH pour le SEC-Na.

En raison de l'instabilité de ces dérivés, nous n'avons pas réalisé d'expériences à des pH alcalins.

Tri-HR dans pH = 8,0 et 2,2 (fig. 22, tabl. 5)

Des solutions tampon de pH acide et alcalin n'influencent que peu le coefficient de perméabilité, indiquant que la fraction ionisée du Tri-HR est minime dans nos expériences.

FIG. 21 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

-- SEC-Na

■ SEC-Na $pH_A = 2,20$ $pH_C = 2,20$

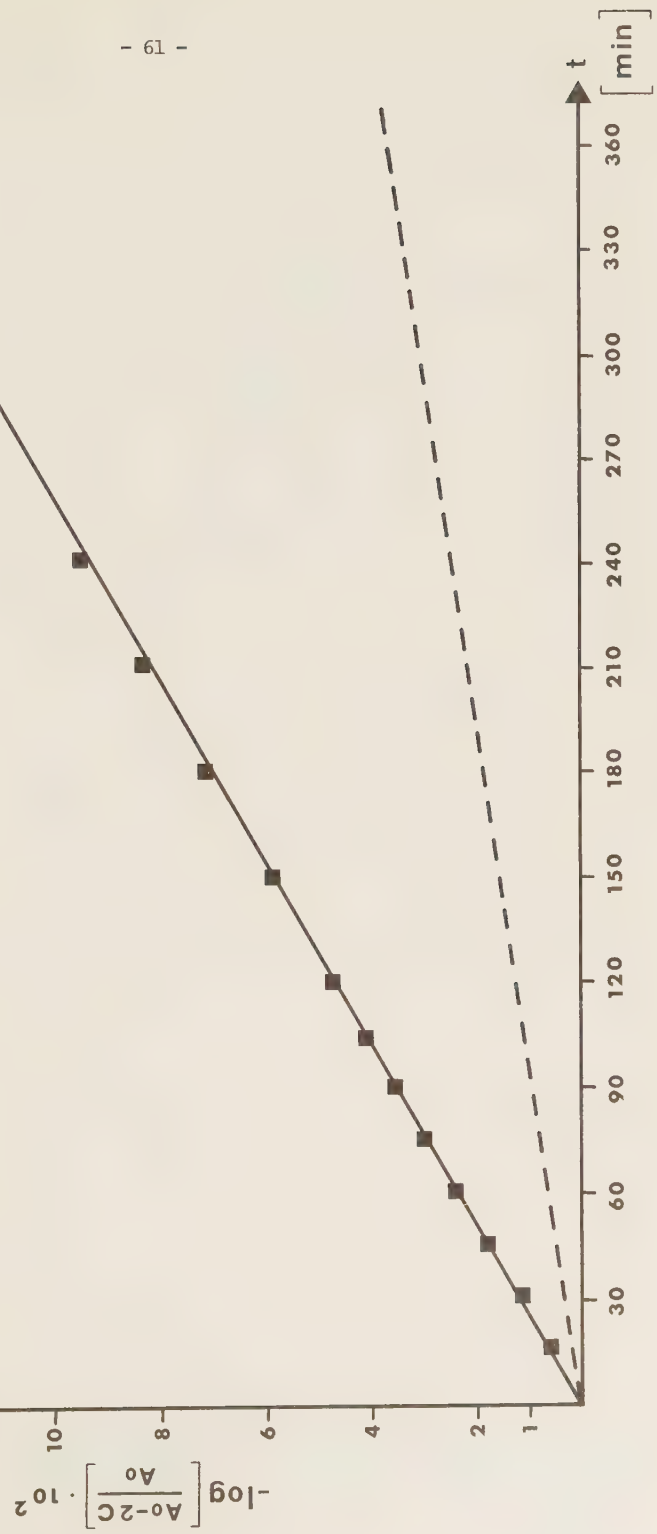


FIG. 22 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE PD 215

-- Tri-HR

■ Tri-HR $pH_A = 8.00$ $pH_C = 8.00$

▲ Tri-HR $pH_A = 2.20$ $pH_C = 2.20$

$$-\log \left[\frac{A_0 - 2C}{A_0} \right] \cdot 10^2$$

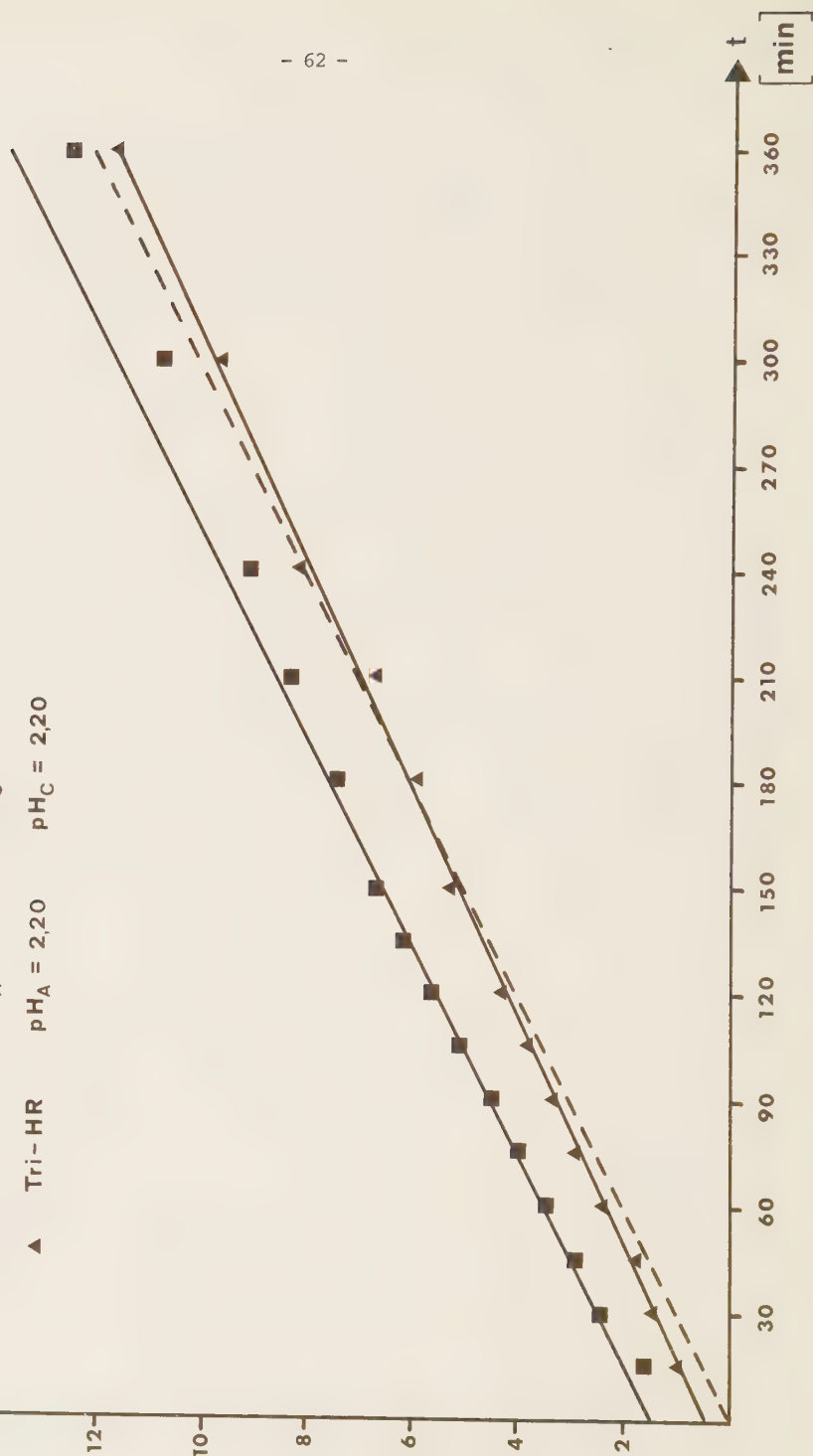


Tableau 3

Coefficient de perméabilité apparent P_a , rapport R et test de parallélisme pour CAT ($A_0 = 2,5 \times 10^{-4} M$), en présence d'adjuvants et de solutions tampon

Adjuvants	Conc. [pds/vol. %]	$P_a \times 10^8$ [cm x sec ⁻¹]	Pente $b \times 10^5$ [M x sec ⁻¹]	$R^{(a)}$	$S_B^2 \times 10^{15(b)}$	Test de parallélisme (cas de 2 droites)		
						t calculé (c)	t table	degrés de liberté (d)
Tween 80 ^R	0	7,31	1,15	---	7,13	**	2,787	25
	0,01	7,03	1,11	0,97	4,49	3,71***	3,707	26
	0,05	5,78	0,91	0,79	5,28	20,24***	3,725	25
	0,10	5,34	0,84	0,73	1,95	8,24***	3,767	23
	1,00	2,15	0,34	0,30	1,09	90,74***	3,792	22
	5,00	0,97	0,15	0,13	3,14	29,23		
Laurylsulfate-Na	0	7,31	1,15	---	7,13	***	3,725	25
	0,1	6,74	1,06	0,92	8,00	7,32***	3,707	26
	0,2	6,07	0,96	0,83	2,60	9,71***	3,707	26
	0,5	5,29	0,83	0,72	4,35	15,59	3,707	26
Dioctyl sulfo-succinate -Na	0	7,31	1,15	---	7,13	***	3,767	23
	0,25	6,27	0,99	0,86	1,84	16,90***	3,745	24
	0,50	5,39	0,85	0,74	0,48	29,05***	3,745	24
	1,00	4,90	0,77	0,67	4,58	11,25	3,745	24
Taurocholate-Na	0	7,31	1,15	---	7,13	***	3,745	24
	0,005	6,61	1,04	0,90	4,49	10,20■	2,064	24
	0,050	6,53	1,03	0,90	2,29	1,22***	3,792	22
	0,500	9,88	1,56	1,36	3,01	72,80***	4,140	14
	1,000	20,14 (12,98)	3,18 (2,05)	2,77 (1,78)	9,32 (4,25)	145,95*** (57,51)		(14) (e)
CMC - Na	0	7,31	1,15	---	7,13	***	3,745	24
	0,1	5,98	0,94	0,82	0,59	23,89***	3,767	23
	0,2	5,44	0,86	0,75	1,45	17,70***	3,767	23
	0,5	4,60	0,73	0,63	1,40	24,34		
Carbopol 941 ^R	0	7,31	1,15	---	7,13	***	3,767	23
	0,05	1,67	0,26	0,23	11,70	64,87		
PG	0	7,31	1,15	---	7,13	***	3,745	24
	5,0 10,0	5,46 4,90	0,86 0,77	0,75 0,67	1,71 2,26	30,85*** 14,29	3,745	24

Tableau 3 (suite)

Adjuvants	Conc. [pds/vol. %]	$P_a \times 10^8$ [cm x sec ⁻¹]	Pente $b \times 10^5$ [M x sec ⁻¹]	$R^{(a)}$	$S_b^2 \times 10^{15}(b)$	Test de parallélisme $t_{calculé}(c)$	t_{table}	prob.	degrés de liberté
PEG - 200	0 5,0 10,0	7,31 4,35 3,44	1,15 0,69 0,54	— 0,60 0,47	7,13 4,69 2,52	*** 24,32*** 17,67	3,745 3,745	0,001 0,001	24 24
Solution tampon									
Sans tampon $pH_A = 2,0$ $pH_C = 2,0$		7,31 6,23	1,15 0,98	— 0,85	7,13 0,47	*** 19,50	3,745	0,001	24

(a) rapport R des vitesses de transport en présence et en absence d'adjuvants

(b) $S_b^2 = \frac{S^2}{S_{xx}}$ où :

S_b^2 = variance par rapport à la pente

S^2 = carré moyen de la variabilité autour de la droite

S_{xx} = somme des écarts élevés au carré

(c) $t_{calculé} = \frac{b_1 - b_2}{\left(\frac{S_b^2}{b_1^2} + \frac{S_b^2}{b_2^2} \right)^{1/2}}$

(d) $n_1 + n_2 - 4$

(e) paramètres de la vitesse initiale

Les astérisques indiquent le degré de significativité :

* valeur significative si
 $t_{calc.} > t_{table}$ pour prob. = 0,05

** valeur très significative si
 $t_{calc.} > t_{table}$ pour prob. = 0,01

*** valeur très fortement significative si
 $t_{calc.} > t_{table}$ pour prob. = 0,001

■ valeur non significative si
 $t_{calc.} < t_{table}$ pour prob. = 0,05

Tableau 4

Coefficient de perméabilité apparent P_a , rapport R et test de parallélisme pour SEC-Na ($A_0 = 2,0 \times 10^{-3} M$),
 en présence d'adjuvants et de solution tampon

Adjuvants	Conc. [pds/vol. %]	$P_a \times 10^8$ [cm x sec ⁻¹]	Pente $b \times 10^6$ [M x sec ⁻¹]	R ^(a)	$S_b^2 \times 10^{15}(b)$	Test de parallélisme (cas de 2 droites)		
						t calculé (c)	t _{table}	degrés de liberté (d)
Tween 80 ^R	0	1,06	1,68	—	0,33	**	2,797	24
	0,01	1,02	1,62	0,96	0,08	2,97***	3,745	24
	0,05	1,06	1,67	0,99	0,08	3,97***	2,064	24
	0,10	1,05	1,66	0,99	0,07	0,82		24
Laurylsulfate-Na	0	1,06	1,68	—	0,33	***	3,745	24
	0,10	1,54	2,44	1,45	0,57	25,33***	3,745	24
	0,20	2,09	3,30	1,96	0,51	26,14***	3,745	24
	0,50	2,96	4,68	2,79	0,77	38,55		24
Dioctyl sulfo-succinate -Na	0	1,06	1,68	—	0,33	***	3,745	24
	0,25	1,67	2,64	1,57	0,37	36,23***	3,745	24
	0,50	2,28	3,60	2,14	1,11	24,94***	3,745	24
	1,00	3,00	4,74	2,82	1,06	24,46		24
Taurocholate-Na	0	1,06	1,68	—	0,33	***	3,745	24
	0,005	0,89	1,41	0,84	0,09	13,17***	3,745	24
	0,050	1,06	1,68	1,00	0,08	20,77***	3,745	24
	0,500	2,38	3,76	2,24	0,49	87,03***	3,725	25
	1,000	3,31	5,22	3,11	1,02	37,53	3,707	26

Tableau 4 (suite)

Adjuvants	Conc. [pds/vol. %]	$p_a \times 10^8$ [cm x sec ⁻¹]	Pente $b \times 10^6$ [M x sec ⁻¹]	$R^{(a)}$	$S_b^2 \times 10^{15(b)}$	Test de parallélisme (cas de 2 droites)		
						$t_{\text{calculé}} (c)$	t_{table}	degrés de liberté (d)
CMC - Na	0	1,06	1,68	—	0,33	***	3,745	24
	0,1	1,33	2,10	1,25	0,25	***	3,745	24
	0,2	1,79	2,84	1,69	0,67	***	3,745	24
	0,5	2,60	4,11	2,45	1,01	30,98	3,745	24
MC	0	1,06	1,68	—	0,33	***	3,850	20
	0,5	0,77	1,21	0,72	0,59	15,51	3,850	20
Carbopol 941 ^R	0	1,06	1,68	—	0,33	***	3,745	24
	0,05	0,66	1,04	0,62	0,11	30,48	3,745	24
PEG - 200	0	1,06	1,68	—	0,33	***	3,745	24
	5,0 10,0	1,00 0,96	1,57 1,52	0,93 0,90	0,19 0,35	4,82 [*] 2,16	2,064 0,05	24
Solution tampon								
Sans tampon $pH_A = 2,2$ $pH_C = 2,2$								
		1,06 4,15	1,68 6,55	— 3,90	0,33 0,54	165,08 ^{***}	3,745	24

Explications : v. tabl. 3

Tableau 5

Coefficient de perméabilité apparent P_a , rapport R et test de parallélisme pour Tri-HR ($A_0 = 5,0 \times 10^{-5} M$), en présence d'adjuvants et de solutions tampon

Adjuvants	Conc. [pds/vol. %]	$P_a \times 10^8$ [cm x sec ⁻¹]	Pente $b \times 10^6$ [M x sec ⁻¹]	R (a)	$S_D^2 \times 10^{15} (b)$	Test de parallélisme (cas de 2 droites)		
						t calculé (c)	t table	prob. degrés de liberté (d)
Tween 80 ^R	0	3,60	5,69	---	5,03	■ 0,11 ■ 0,50	2,056	0,05 26
	0,1	3,61	5,70	1,00	2,79		2,064	0,05 24
	1,0	3,59	5,66	0,99	3,60			
Laurylsulfate-Na	0	3,60	5,69	---	5,03	*** 25,91*** 48,63*** 14,05	3,707	0,001 26
	0,1	2,39	3,77	0,66	0,46		3,745	0,001 24
	0,2	0,93	1,46	0,26	1,80		3,819	0,001 21
	0,5	0,45	0,70	0,12	1,13			
Dioctyl sulfo-succinate -Na	0	3,60	5,69	---	5,03	*** 41,97*** 16,05*** 8,04	3,767	0,001 23
	0,25	1,47	2,32	0,41	1,42		3,922	0,001 18
	0,50	0,92	1,45	0,25	1,52		4,015	0,001 16
	1,00	0,61	0,97	0,17	2,04			
CMC - Na	0	3,60	5,69	---	5,03	*** 9,63*** 7,30	3,725	0,001 25
	0,5	3,12	4,93	0,87	1,19		3,745	0,001 24
	1,0	2,84	4,49	0,79	2,45			
Carbopol 941 ^R	0	3,60	5,69	---	5,03	43,73	3,725	0,001 25
		1,33	2,10	0,37	1,71			
PEG - 200	0	3,60	5,69	---	5,03	*** 21,22*** 2,15	3,745	0,001 24
	5,0	2,41	3,81	0,67	2,82		2,074	0,05 22
	10,0	2,27	3,58	0,63	8,58			
Solutions tampon								
Sans tampon								
pH _A = 2,2 pH _C = 2,2		3,60 3,29	5,69 5,19	---	5,03 1,39	6,24	3,725	0,001 25
Sans tampon								
pH _A = 8,0 pH _C = 8,0		3,60 3,36	5,69 5,30	---	5,03 9,71	3,21	2,779	0,01 26

Explications : v. tabl. 3

DEUXIEME PARTIE

II. Etude du transport des flavonoïdes à travers des membranes lipidiques composées solides non poreuses

II.1 Généralités

Reprenant les mêmes flavonoïdes et la même cellule de diffusion, nous avons étudié les conditions de transport à travers des membranes non poreuses, constituées d'un support mécanique et de phospholipides.

On peut classer ces membranes lipidiques composées en 2 catégories, selon leur procédé de fabrication (tabl. 6) :

- a) Imprégnation d'un support déjà formé avec des solutions de lipides⁷⁰⁻⁸⁶. Si le support est poreux, la membrane effective est représentée par les canaux du support poreux, remplis par les lipides. Le transport se fait par ces canaux lipidiques, la dimension des pores étant plus grande que celle de la molécule pénétrante.
- b) Evaporation de solutions lipidiques contenant le produit support, comme filmogène, en solution⁸⁷⁻⁹⁶.

Tableau 6

*Principaux procédés de préparation des membranes
lipidiques composées*

Supports	Imprégnations	Références
Millipore ^R	Huile d'arachide	70
"	Huile d'olive	71,72
"	Phosphatidylsérine	73
"	Céphaline-cholestérol	74-77
"	Myristate isopropylique	78,79
Nitrate de cellulose	Principalement acide caprylique	80-83
Disque de fibre de verre	Mélange huile-polymère	84,85
Polyamide	Phosphate tributylque-Miglyol ^R -lécithine	86
Substances filmogènes	Lipides incorporés au support	Références
Collodion	Huile de paraffine	87
"	Acide stéarinique-cholestérol-phosphatidyl-l-sérine	88
"	Lécithine	89,90
"	Lécithine-céphaline	91-93
Ethylcellulose	Lécithine-céphaline-cholestérol-huile de paraffine	94-96

II.2 Etude théorique

In vivo, le passage de substances de poids moléculaire supérieur à 100 se fait rarement à travers des pores, dont le diamètre est voisin de $4 \text{ \AA}^{97}$. Pour cette raison, nous avons choisi pour la suite de notre étude un modèle de membrane homogène, non poreuse, susceptible de mieux simuler le comportement *in vivo*.

Dans ce cas, le transport de substances dépend de l'adsorption des molécules à la surface de la membrane et de leur solubilité dans cette dernière.

Ce phénomène de partage est, par rapport à la membrane de cellophane, le principal point de dissemblance entre les deux modèles. De plus, une membrane de cellophane a un poids sec correspondant à une fraction du poids de la membrane hydratée. Grâce à ce processus de pénétration de l'eau, on peut déduire que la solubilité du principe actif dans la membrane fortement hydratée correspond à la solubilité dans la phase aqueuse, le coefficient de partage membrane/phase aqueuse étant très proche de l'unité, quel que soit le principe actif.

Pour une membrane non poreuse, le coefficient de perméabilité est fonction du coefficient de diffusion du soluté dans la membrane et du coefficient de partage⁹⁸, lui-même quotient de la concentration dans la membrane par celle dans l'eau.

Les résultats de la détermination des coefficients de partage apparents (tabl. 1) laissent prévoir que seule la CAT a une certaine affinité lipidique et que le taux de pénétration de cette substance prédominera sur celui des autres dérivés.

En exprimant graphiquement la concentration des flavonoïdes dans le compartiment récepteur C en fonction du temps, selon la méthode déjà utilisée pour les membranes de cellophane, les courbes deviennent linéaires après une période initiale importante, correspondant au temps de latence t_0 . En faisant des corrections sur la partie initiale non linéaire t_0 , obtenue graphiquement par extrapolation de la droite à l'abscisse (t_0 correspondant, après extrapolation, à l'abscisse à l'origine), on a tracé $-\log [A_0 - 2C/A_0]$ en fonction de $[t-t_0]$.

La pente, calculée par la méthode des moindres carrés, est également exprimée par $[2 P / 2,303 h]$.

Chaque point correspond à la moyenne de 4 expériences.

Le temps de latence précédant l'apparition du principe actif à vitesse constante dans le compartiment récepteur, reflète la rétention initiale par la membrane. La droite ultérieure indique les conditions en régime constant, exprimant le maintien de la concentration du soluté dans la membrane à une valeur constante, de sorte que la libération du principe actif à l'interface B-C est identique au degré d'adsorption à l'interface A-B. La concentration dans le compartiment C, par unité de temps, est d'autant plus élevée que le nombre de molécules pénétrant dans la membrane est grand.

L'équation classique⁹⁹ décrivant les processus de transport non stationnaires d'un soluté à travers une membrane homogène est la suivante :

$$t_0 = \frac{h_M^2}{6 D_M} \quad (21)$$

où :

t_o = temps de latence

h_M = épaisseur de la membrane

D_M = coefficient de diffusion dans les constituants de la membrane

Récemment, *Flynn et coll.*¹⁴ ont dérivé l'équation suivante :

$$t_o = \frac{K h_M h_{AQ}}{2 D_{AQ}} \quad (22)$$

Elle n'est valable que si l'épaisseur des deux couches aqueuses (h_{AQ}) de chaque côté de la membrane est identique. K est le coefficient de partage et D_{AQ} désigne la diffusibilité du soluté au niveau des couches aqueuses adjacentes à la membrane. L'équation (22) signifie que le temps de latence est directement proportionnel à la résistance R_{AQ} ($R_{AQ} = h_{AQ}/D_{AQ}$) du soluté dans les couches aqueuses de diffusion, à l'épaisseur de la membrane et au coefficient de partage.

II.3 Partie expérimentale

II.3.1 Choix des produits

Ultramid 1C^{R*}

Il s'agit d'un interpolymide constitué de 3 composants respectivement à base de caprolactame, d'hexaméthylènediamine/ acide adipique et de p,p'-diamino-dicyclohexylméthane/acide adipique.

* BASF, D-6700 Ludwigshafen, R.F.A.

Il est livré sous forme de petites plaquettes de 10x10x2 mm.

Nous avons choisi ce support en raison des propriétés suivantes :

- Absence de plastifiants ou d'autres adjuvants, susceptibles de créer des interactions secondaires indésirables dans nos expériences.
- Viscosité élevée des solutions, réduisant lors du séchage par évaporation, la migration de liquide de la partie centrale vers les zones latérales, ce qui évite une accumulation de phospholipides vers les zones latérales de la membrane.
- Pouvoir de rétention vis-à-vis des molécules de phospholipides, qui ne sont pratiquement pas libérés, même après un séjour de 24 h dans l'eau.
- Formation de membranes régulières, non cassantes, souples, mécaniquement résistantes, se séparant facilement du support, aux propriétés reproductibles.
- Stabilité pendant une durée d'expérience prolongée, sans perte d'intégrité, qui pourrait modifier les caractéristiques de transport.

Lécithine purifiée *

- Présence dans les lipides de la muqueuse de l'intestin.
- Insolubilité dans l'eau.

* Lecithinum purum ex ovo (Siegfried S.A., CH-4800 Zofingue).

- Existence de groupements hydrophiles dans la molécule, favorisant le transport d'un principe actif polaire à travers la barrière.

Alcool absolu

- Bon solvant pour l'Ultramid^R et la lécithine.
- Lente vitesse d'évaporation, favorable à la formation d'une surface lisse et régulière.
- Teneur en eau presque nulle, alors que la présence d'eau dans la solution provoquerait la formation de pores dans le squelette de la membrane.

II.3.2 Purification de la lécithine

Nous avons choisi la méthode de Fürst et Falk⁹⁰, qui est elle-même une modification de procédés précédemment décrits^{100,101}. La résine échangeur d'ions est une résine anionique Dowex^{*}, sous forme de bicarbonate. La lécithine obtenue a une couleur jaune pâle et une consistance cireuse.

II.3.3 Préparation de la solution d'Ultramid 1C^R à 20%

On verse 40,0 g d'éthanol absolu dans un ballon à fond rond, puis on ajoute 10,0 g d'Ultramid 1C^R par petites fractions, sous agitation mécanique, en évitant l'agglomération des plaquettes. On chauffe à reflux à 70⁰ C, le réfrigérant étant muni d'un tube de chlorure de calcium. La dissolution est complète après environ 15 h d'agitation.

* Dowex 1x4, 50-100 mesh, forme Cl⁻ (Fluka A.G., CH-9470 Buchs).

II.3.4 Composition et préparation des membranes

Membranes d'Ultramid 1C^R :

Ultramid 1C ^R 20%	5,0 g
Ethanol absolu	5,0 g

Membranes d'Ultramid 1C^R + lécithine :

Lécithine purifiée	0,40 g
Ethanol absolu	4,80 g
Ultramid 1C ^R 20%	4,80 g

On dissout 0,40 g de lécithine purifiée dans 4,80 g d'éthanol absolu, sous agitation magnétique. On ajoute 4,80 g de la solution d'Ultramid 1C^R à 20%, chauffée préalablement à 40° C et on agite pendant 3 minutes. On chauffe jusqu'à obtention d'une température de 40° C, on filtre sur un entonnoir de Buchner, puis on coule 1,00 g de la solution filtrée maintenue à 35° C dans un support* placé sur une surface horizontale. On recouvre le support avec un bēcher renversé et laisse reposer pendant 9 h à température ambiante, jusqu'à gélification et formation finale du film. On détache ensuite la membrane, que l'on trempe au moins 15 h dans l'eau distillée. Avant l'emploi, on découpe des membranes de 39 mm de diamètre, ce qui permet d'éliminer les bords, puis on rince encore une fois à l'eau distillée.

Les membranes d'Ultramid 1C^R sans lécithine sont fabriquées de la même manière.

* Support en styrène à surface plane, comportant au centre une partie circulaire de 43 mm de diamètre avec un rebord de 2 mm.

II.4 Tests de contrôle des membranes

II.4.1 Contrôle de l'absence de pores

a) Variation du pH en fonction du temps

Dans le cas d'une membrane poreuse, les ions hydrogène seraient distribués entre les phases aqueuses A et C à travers les pores de la phase B, représentée par la membrane. Le compartiment A est rempli avec une solution tampon de pH 1,2 et le compartiment C avec une solution tampon de pH 7,4. Un changement de la valeur du pH est une indication de la perméabilité ionique. La faible dimension des ions hydrogène et leur grande mobilité permettent de déceler la présence des pores.

On a constaté, avec des expériences de 24 h, effectuées à une température de 30° C, un abaissement minime de la valeur du pH dans C, ne dépassant jamais 0,15 unité, indiquant l'absence de pores.

b) Passage de l'eau

Les essais décrits ci-dessous ont été effectués pour déterminer si l'eau joue un rôle dans le transport à travers la barrière, ce qui indiquerait un passage par la voie poreuse.

Le compartiment A de la cellule de diffusion est rempli avec une solution de carboxyméthylcellulose sodique à 5%, l'autre partie de la cellule contenant de l'eau distillée. Après 24 h, on n'a constaté aucune augmentation de volume en A.

Une autre manière de contrôler l'absence de passage de l'eau consiste à ne remplir que le compartiment A avec de

l'eau distillée, l'autre restant vide. Après 24 h, l'interface B-C demeure sèche et le volume en A n'est pas modifié.

Enfin, nous avons essayé de filtrer de l'eau sous vide (15 Torr, température ambiante). Après 30 minutes, on ne décèle aucun passage d'eau ni de changement de volume sur la face supérieure de la membrane. De plus, on n'a constaté aucune modification macroscopique de cette membrane, preuve de sa résistance mécanique.

II.4.2 Epaisseur des membranes

Après 24 h d'expérience, l'épaisseur des membranes n'est pas modifiée significativement, par rapport aux mesures effectuées au temps zéro.

Tableau 7

Epaisseur des membranes

Membranes	Epaisseurs* $\left[\mu \right]$ à $t = 0$
Ultramid 1C ^R	60 ($\pm$ 2,1)
Ultramid 1C ^R + lécithine	89 ($\pm$ 2,0)
Cellophane Du Pont de Nemours PD 215	55

* Les valeurs entre parenthèses expriment les limites de confiance de la moyenne de 50 déterminations (effectuées à 10 niveaux différents de 5 membranes, préparées avec 5 solutions fraîches), avec un seuil de probabilité de 0,05.

Le tabl. 7 montre que l'épaisseur des membranes ainsi préparées est plus élevée que celle des membranes de cellophane. Cette épaisseur supérieure des membranes lipidiques est volontaire, car elle diminue le risque de formation de pores et de la perméabilité ionique qui en résulterait. Puisque le poids total, par unité de surface de membrane, est constant et que les densités d'Ultramid 1C^R et de lécithine sont similaires, on peut conclure que l'épaisseur de la membrane à l'état sec, n'est pas affectée par l'incorporation de lécithine. Mais comme l'indique le tabl. 7, la membrane phospholipidique hydratée est plus épaisse, la lécithine étant susceptible de gonfler en milieu aqueux.

II.5 Résultats et interprétation

Les résultats sont exprimés par les fig. 23 à 25 et le tabl. 8 (p. 84).

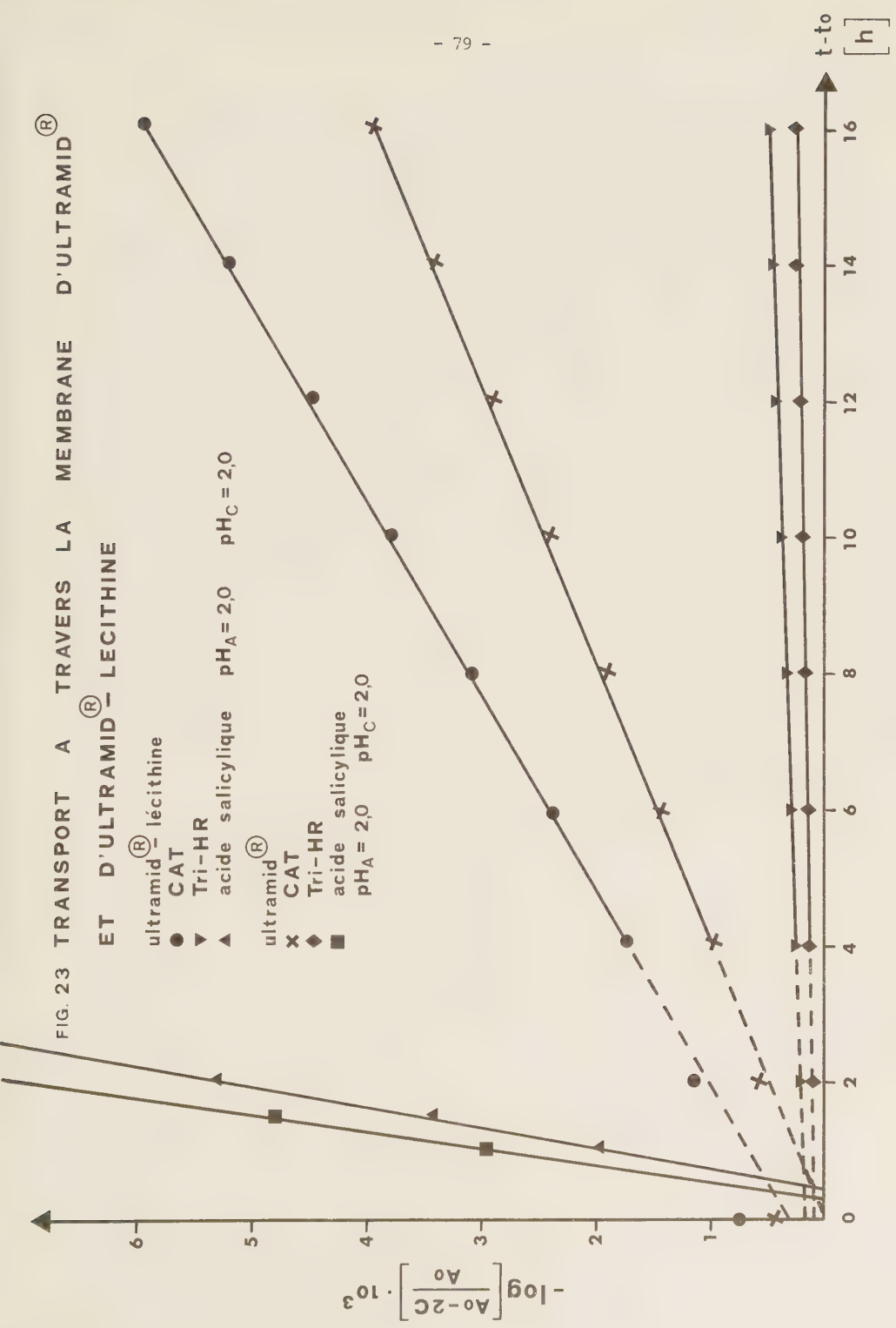
La fig. 23 représente les cinétiques de transport en régime constant, à la fin du temps de latence, indiqué dans le tabl. 8.

Les coefficients de perméabilité apparents, calculés sur la partie linéaire de la courbe, correspondant à la vitesse en régime constant, montrent comme prévu, que seule la CAT passe la membrane lipidique, conformément à sa solubilité dans les lipides.

Quant au passage du Tri-HR, substance hydrosoluble, il est presque insignifiant, même après 24 h d'expérience.

Le SEC-Na n'a révélé aucun passage, même à pH 2.

FIG. 23 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE D'ULTRAMID[®]
ET D'ULTRAMID[®] - LECITHINE



Dans un but comparatif, nous avons fait un essai parallèle avec l'acide salicylique, qui se trouve surtout sous forme non ionisée; le transfert est très rapide, mettant en évidence les caractéristiques lipidiques de la membrane. Comme on le constate donc, les membranes ainsi préparées sont fortement perméables aux substances non ionisées liposolubles. L'incorporation de lécithine au support de nylon augmente la vitesse de transport des flavonoïdes de manière hautement significative et diminue le temps de latence.

Selon *Furusawa et coll.*¹⁰², la vitesse de transport de substances acides chargées négativement, dans un système à deux phases, est fortement activée par l'adjonction de lécithine à la phase chloroformique. Ce phénomène peut s'expliquer par une interaction entre des dérivés acides ionisés et la lécithine. Dans une solution tampon de pH 2 (fig. 23), le transport de l'acide salicylique n'est pas influencé par une adjonction de 4% de lécithine, puisqu'il se trouve sous forme non ionisée.

Si les différences de coefficients de partage de chaque substance étudiée expliquent les variations de leur vitesse de transport, il ne faut pas négliger les interactions éventuelles entre ces substances et les composants de la membrane.

En plus des interférences déjà citées entre lécithine et anions, plusieurs travaux¹⁰³⁻¹⁰⁷ décrivent les mécanismes d'interactions entre polyamide et polyphénols ou autres substances à groupements protoniques. Ces interactions peuvent fort bien expliquer les temps de latence constatés avec la CAT et le Tri-HR.

Mentionnons l'influence de deux tensio-actifs, l'un anionique et l'autre non ionique, sur la cinétique de la CAT (fig. 24). Dans les deux cas, on constate une diminution de la vitesse de transport. Les micelles diminuent la concentration de catéchine "libre" disponible pour le passage à travers la membrane.

Enfin, les variations de pH (fig. 25) simulant les milieux gastrique et intestinal, modifient également les conditions de transport. Le coefficient de perméabilité en milieu "gastrique" simulé est inférieur à celui obtenu en milieu "intestinal". Cette constatation est en contradiction avec l'hypothèse de partage en fonction du pH, appliquée aux substances acides diffusant par transport passif. Par contre, comme on l'a déjà vu pour les expériences avec les membranes de cellophane, la catéchine forme, en milieu acide, des produits de polymérisation, dont la solubilité aqueuse est inférieure à celle des monomères.

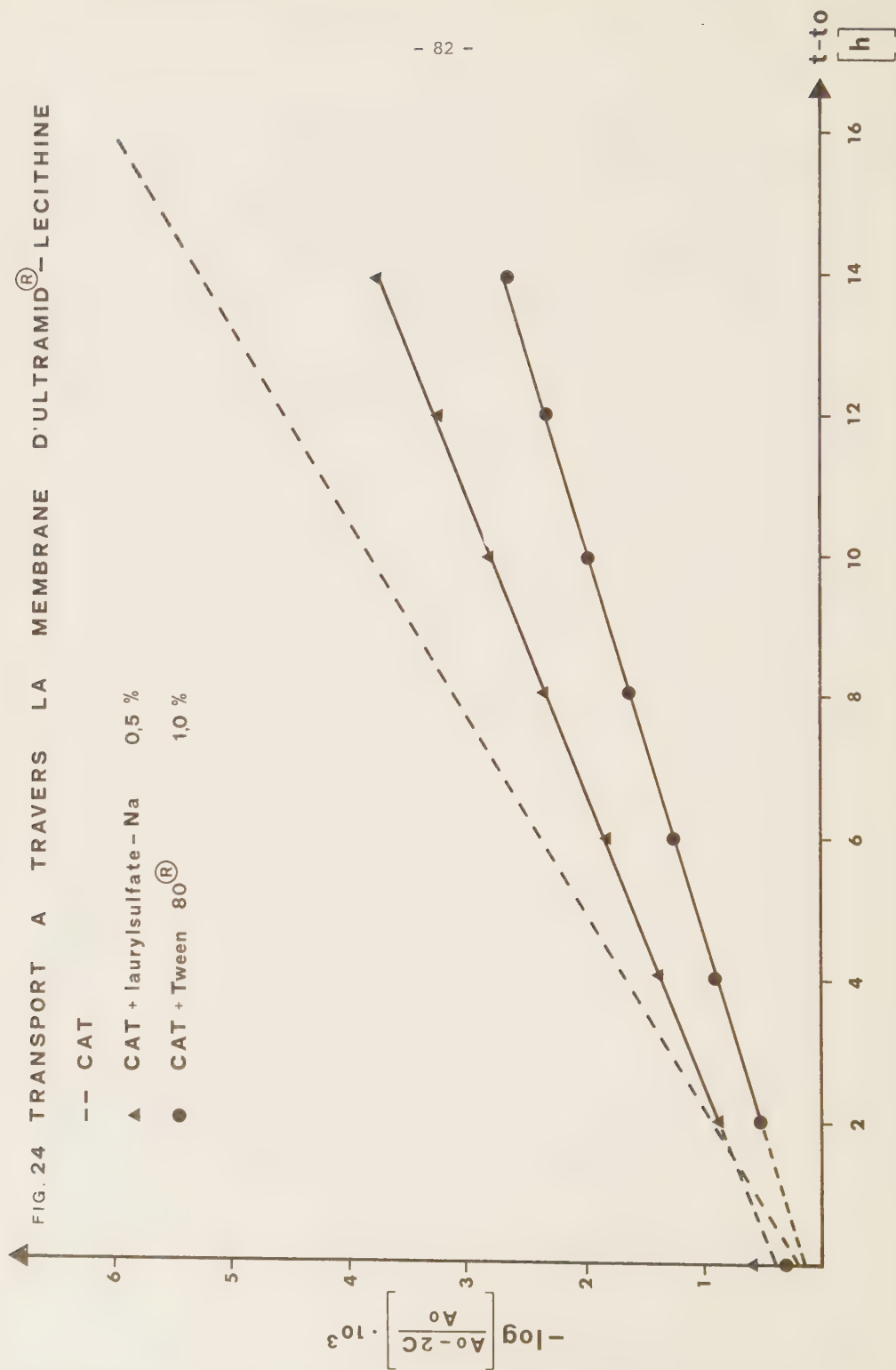


FIG. 25 TRANSPORT A TRAVERS LA MEMBRANE D'ULTRAMID[®]-LECITHINE

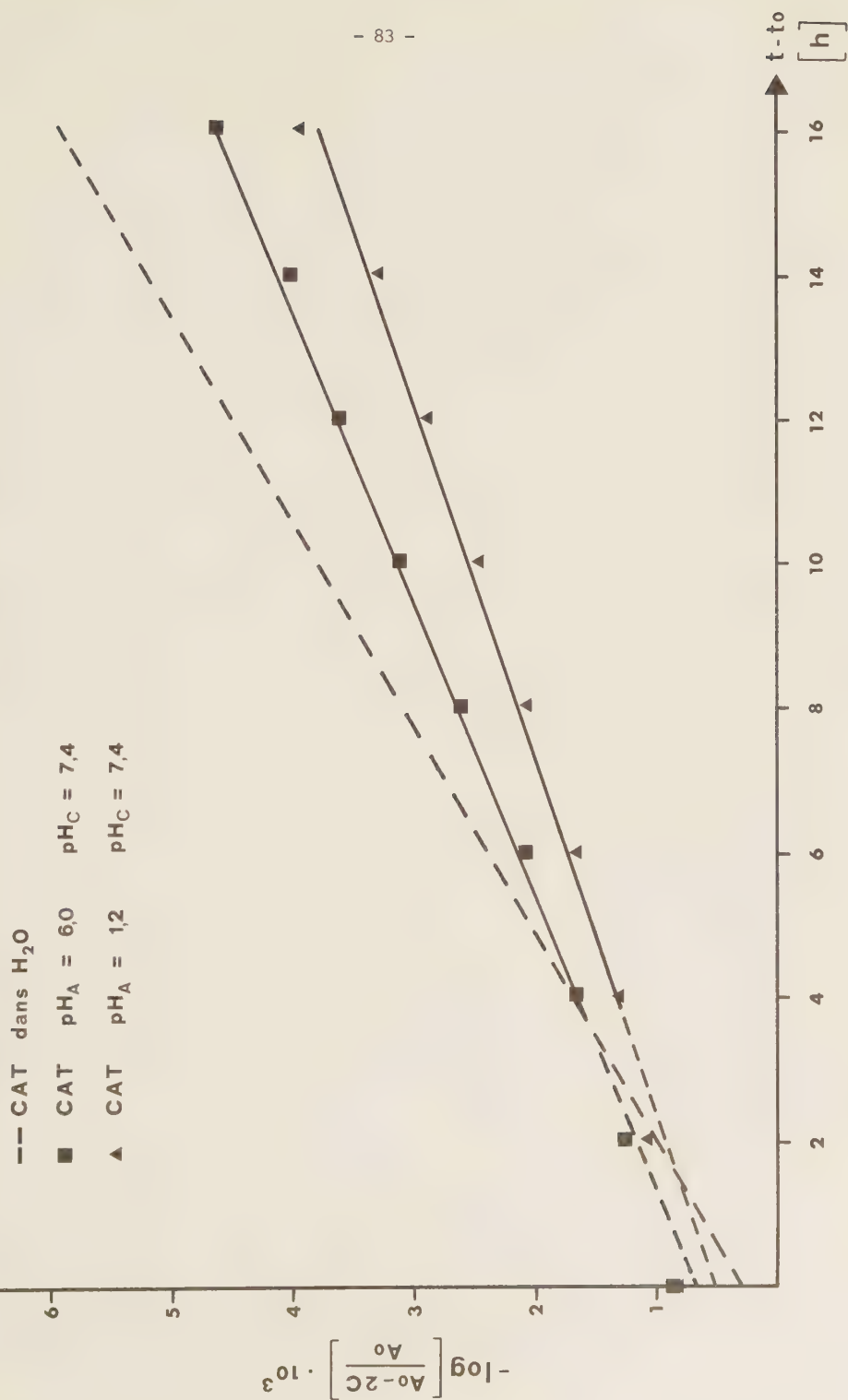


Tableau 8

Coefficient de perméabilité apparent P_a , rapport R , temps de latence t_o et test de parallélisme pour CAT, Tri-HR et acide salicylique (ACS) en présence de tensio-actifs et de solutions tampon, avec membrane d'Ultramid 1C^R + lécitine (a) (les valeurs entre parenthèses concernent le transport à travers la membrane d'Ultramid 1C^R(b) sans lécitine)

Solutions ($A_o = 5,0 \cdot 10^{-3} M$)	$P_a \times 10^{10}$ [cm·sec ⁻¹]	Pente $b \times 10^8 (c)$ [M·sec ⁻¹]	$R^{(d)}$	t_o [h]	$s_b^2 \cdot 10^{20} (e)$	Test de parallélisme (cas de 2 droites)		
						$t_{calculé} (f)$	t_{table}	degré de liberté (g)
CAT	10,24 (4,87)	10,00 (7,05)		7,5 (9,0)	3,31 (72,91)	37,790 ***	4,587	10
Tri-HR	0,619 (0,183)	0,604 (0,264)		6,0 (7,0)	8,04 (11,40)	7,711 ***	4,587	10
ACS ($pH_A = 2,0$; $pH_C = 2,0$)	113,19 (83,47)	110,45 (120,81)		1,5 (1,3)	$7,02 \cdot 10^5$ (4,43 · 10 ⁵)	0,968 ■	2,101	18
Agents tensio-actifs								
CAT								
CAT + Tween R 80 1,0%	10,24 3,67	10,00 5,02	-- 0,50	-- 9,0	3,31 0,052	271,54 ***	4,781	9
CAT								
CAT + laurylsulfate-Na 0,50%	10,24 6,87	10,00 6,70	-- 0,61	-- 8,3	3,31 2,93	132,10 ***	4,781	9
Solutions tampon								
Sans tampon								
$pH_A = 1,20$ $pH_C = 7,40$	10,24 6,19	10,00 6,04	-- 0,60	-- 5,7	3,31 485,12	17,92 ***	4,587	10
Sans tampon								
$pH_A = 6,00$ $pH_C = 7,40$	10,24 7,09	10,00 6,92	-- 0,69	-- 5,7	3,31 164,65	23,76 ***	4,587	10

- (a) Epaisseur de la membrane hydratée, $h = 89 \mu + 2,0$
 (b) " " " " , $h = 60 \mu + 2,1$

(c) La pente est calculée au moyen de l'ordinateur CDC 3800, après une période initiale respectivement de 1 h, 10 h et 12 h pour AcS, CAT et Tri-HR, CAT + tensioactifs

(d) Rapport R des vitesses de transport avec et sans adjuvant

(e) $s_b^2 = \frac{s_{xx}^2}{s_{xx}}$ où :

s_b^2 = variance par rapport à la pente

s^2 = carré moyen de la variabilité autour de la droite

s_{xx} = somme des écarts élevés au carré

(f) $t_{\text{calculé}} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2}}$

(g) $n_1 + n_2 - 4$

Les astérisques indiquent le degré de significativité :

- * valeur significative si $t_{\text{calc.}} > t_{\text{table}}$ pour prob. = 0,05
- ** valeur très significative si $t_{\text{calc.}} > t_{\text{table}}$ pour prob. = 0,01
- *** valeur très fortement significative si $t_{\text{calc.}} > t_{\text{table}}$ pour prob. = 0,001
- valeur non significative si $t_{\text{calc.}} < t_{\text{table}}$ pour prob. = 0,05

TROISIEME PARTIE

III. Etude du transport des flavonoïdes à travers des membranes liquides organiques dans un modèle à trois phases

III.1 Généralités

Les systèmes à membranes liquides se situent parmi les plus importants modèles de transport dans la recherche pharmaceutique. Le principe de ces modèles repose sur une séparation de deux phases aqueuses, correspondant respectivement au lumen gastro-intestinal et au plasma, par une phase organique surnageante, simulant la nature lipidique d'une membrane biologique.

Ce modèle physico-chimique est constitué d'une cellule de partage, qui permet de comparer la cinétique de différentes substances. C'est la nature de l'interface qui détermine la vitesse de transport.

L'agitation des trois phases liquides peut être obtenue soit par mouvement lent des récipients^{102,108-114}, soit par un agitateur dans chacune des phases¹¹⁵⁻¹²³.

Les phases organiques les plus utilisées sont résumées dans le tableau 9, avec les références bibliographiques correspondantes.

Tableau 9

Solvants organiques utilisés dans les modèles à trois phases

Solvants	Références
Cyclohexane	108-114, 118, 120-122
Cyclohexane + alcool amylique	118, 120, 121
Cyclohexane + 1-octanol	108, 109, 113, 114, 122
Cyclohexane + décanol	118, 122
Chloroforme	102
n-pentane, n-hexane, 1-octanol, n-hexylalcool, toluène, benzène	110
1-pentanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-méthylbutanol	115
Acétate isopentylique	121

Pour l'étude *in vitro* de l'absorption des substances médicamenteuses, plusieurs appareils ont été proposés. Le premier modèle présenté est celui de *Doluisio* et *Swintosky*¹⁰⁸. Il a la forme d'un Y dont les deux branches sont tournées vers le bas. Cet appareil a l'inconvénient de provoquer une émulsion lorsque l'agitation par balancement est trop rapide. Le passage du principe actif ne se fait donc plus uniquement par l'intermédiaire de la phase organique.

Les modèles proposés par *Perrin*¹¹⁸ et *Robertson*¹¹⁴ sont décrits dans cette étude.

*Yunker et coll.*¹²³ proposent un modèle constitué par deux bacs situés côté à côté; chacun d'eux contient une phase aqueuse. La phase organique est recyclée par un système de pompe. Cet appareil ne présente pas de risques d'émulsion entre les

différentes phases. Toutefois, le passage de la substance se fait seulement par un système d'agitation lent qui a pour conséquence une prolongation de la durée d'expérience.

L'inconvénient mentionné ci-dessus ne se présente plus dans l'appareil proposé récemment par *Bastide et coll.*¹²². Un dispositif de recyclage de la phase organique, complété par un système d'agitation dans les différentes phases, permet d'obtenir des cinétiques rapides sans aucun risque d'émulsion.

Pour des raisons pratiques et de reproductibilité, nous avons retenu les modèles de *Perrin* et de *Robertson*.

III.2 Importance de la saturation des phases liquides

Pour une étude de partage, il est indispensable de connaître les propriétés physico-chimiques de la phase organique.

A l'aide de mesures de la constante diélectrique (ϵ), de la viscosité (η) et de RMN, *Lippold et Adel*¹²⁴, ont donné des indications sur l'association moléculaire dans le n-octanol et des mélanges n-octanol + eau.

Des n-alcools à chaîne droite existent avant tout sous forme de polymères linéaires, alors que ceux à chaîne ramifiée se trouvent sous forme de polymères cycliques.

L'adjonction d'eau influence cette association moléculaire. En effet, après adjonction d'eau au n-octanol, la constante diélectrique et la viscosité décroissent (tabl. 10).

La diminution de ces deux caractéristiques a pu être expliquée par une formation d'aggrégats plus petits, centrés autour de l'eau. La présence d'eau dans le n-octanol provoque un "effet de dépolymérisation" des chaînes droites. *Lippold* admet

que dans des mélanges n-octanol-eau, les agrégats centrés autour de l'eau ont la composition suivante :

$$\text{alcool} : \text{H}_2\text{O} = 4 : 1$$

*Khalil et Martin*¹¹⁰ ont étudié le paramètre de solubilité (= valeur δ , selon *Hildebrand*) et ont trouvé que l'octanol saturé d'eau a une valeur δ plus élevée que celle de l'octanol non saturé.

Le changement de quelques facteurs physico-chimiques, dû à une saturation de la phase organique par l'eau, est résumé dans le tabl. 10.

Tableau 10

Valeur ϵ , d (densité), η et δ de n-octanol et de n-octanol saturé d'eau

	$\epsilon (20^\circ\text{C})^{124}$	$d (20^\circ\text{C})^{124}$	$\eta (20^\circ\text{C}) [\text{cp}]^{124}$	δ^{110}
n-octanol	10,25	0,8263	8,8923	10,3
n-octanol saturé d'eau	9,05*	0,8309*	8,5410*	10,8

* 2,5 ml d'eau dans 100,0 ml de n-octanol.

III.3 Etude théorique

Un processus de transfert d'un principe actif peut être représenté par deux réactions consécutives et réversibles, de premier ordre.

Ce modèle est schématisé par :



où $[A]$, $[B]$ et $[C]$ sont les concentrations respectives d'un principe actif dans les compartiments A, B et C au temps t . Les trois équations différentielles, dominant les cinétiques compartimentales de premier ordre ont la forme suivante :

$$V_A \frac{dA}{dt} = - V_A k_1 A + V_B k_{-1} B \quad (24)$$

$$V_B \frac{dB}{dt} = V_A k_1 A - V_B k_{-1} B - V_B k_2 B + V_C k_{-2} C \quad (25)$$

$$V_C \frac{dC}{dt} = V_B k_2 B - V_C k_{-2} C \quad (26)$$

où V_A , V_B et V_C indiquent les volumes des compartiments respectifs.

Les symboles k_1 et k_2 représentent les constantes de vitesse apparentes du transfert direct, k_{-1} et k_{-2} les constantes correspondantes de vitesse apparentes dans la direction inverse. Au temps zéro, le principe actif se trouve uniquement dans le compartiment A; ainsi au temps $t = 0$, $A(0) = A_0$ et $B(0) = C(0) = 0$.

Les solutions des équations 24-26 pour l'obtention des constantes de vitesse ont été programmées (programme itératif, ajustant les courbes) sur l'ordinateur CDC 3800 (langage FORTRAN). La "sortie" de l'ordinateur fournit l'impression des quatre constantes de vitesse de premier ordre et un tracé de la concentration du principe actif dans les compartiments A, B et C en fonction du temps. Le programme utilisé est basé sur le principe du maximum

de vraisemblance. Ce procédé permet de faire directement des comparaisons entre les concentrations calculées (ou théoriques) dans A, B et C en fonction du temps et celles déterminées expérimentalement. De plus, cette méthode a l'avantage de situer rapidement l'ordre de grandeur des rapports étroits existant entre le système expérimental et les cinétiques de premier ordre.

Pour obtenir les constantes de vitesse vraies, il faut considérer les effets du pH sur la dissociation d'un principe actif en admettant que seule la partie non ionique de la molécule est transférée à travers la phase organique.

Selon *Khalil et coll.*¹¹⁰, la constante de vitesse vraie k' est liée à la constante de vitesse apparente k par l'équation suivante :

$$k' = \frac{k}{(1-\alpha)} \quad (27)$$

où α est le degré d'ionisation $[I/(U+I)]$ du principe actif à un pH spécifique. U et I sont les pourcentages respectifs du principe actif non-ionisé et ionisé.

En introduisant $\alpha = I/(U+I)$ dans (27) on obtient^{108,112} :

$$k' = \frac{U + I}{U} \cdot k \quad (28)$$

La constante de vitesse vraie, k' , est indépendante du pH; par contre, la constante de vitesse apparente, k , est fonction du pH existant.

Dans cette étude, seules les constantes de vitesse apparentes sont prises en considération.

Quelques graphiques sont présentés sous forme de droites construites par l'application de l'équation de *Yunker* et *Borodkin*¹²³ :

$$\ln \frac{Q_A^0 - Q_A^\infty}{Q_A - Q_A^\infty} = K(k_1 + k_{-1}) \cdot t \quad (29)$$

où Q_A^0 est la quantité de principe actif dans le compartiment A au temps zéro et Q_A^∞ celle de la phase A à l'équilibre.

Un tracé de $\log (Q_A^0 - Q_A^\infty) / (Q_A - Q_A^\infty)$ en fonction du temps est linéaire et la droite, passant par l'origine, a une pente b correspondant à :

$$b = \frac{K}{2,303} (k_1 + k_{-1}) \quad (30)$$

III.4 Partie expérimentale

III.4.1 Choix des produits

Solvant organique :

1-octanol puriss. (Fluka A.G., CH-9470 Buchs).

Adjuvant dans la phase organique B :

lécithinum pur. ex ovo (Siegfried A.G., CH-4800 Zofingue).

(Remarque : avant l'emploi, nous avons purifié la lécithine selon la méthode décrite à la page 74).

Adjuvant dans la phase aqueuse A :

carboxyméthylcellulose-Na (type 12M31P, Hercules Inc.,
Wilmington, Del., U.S.A.).

Solutions tampon de la phase A :

pH = 2,00 (citrate/acide chlorhydrique, Titrisol, Merck).

pH = 6,00 (citrate/solution d'hydroxyde de sodium,
Titrisol, Merck).

Solution tampon de la phase C :

pH = 7,40 (tampon phosphate selon Sørensen).

Produit marqué :

(+)- $\left[\text{U-}^{14}\text{C} \right]$ catéchine (radioactivité spécifique
environ 0,12 $\mu\text{C}/\text{mg}$).

III.4.2 Description des modèles de transport à membranes liquides

A. Modèle de Perrin¹¹⁸

L'appareil (fig. 26) est formé d'une boîte de Plexiglas^R de dimensions intérieures de 15 X 15 X 11 cm, divisée par une paroi centrale (hauteur 4 cm) en 2 compartiments de volume égal. La boîte est démontable et maintenue rigidement sur un support dont le niveau est ajustable.

L'agitation des deux phases aqueuses (A et C) se fait par des agitateurs électromagnétiques de 2 cm à 300 t.p.m., celle de la phase organique surnageante par un moteur synchrone (30 t.p.m.) muni d'une pale métallique rectangulaire (100 X 8 mm).

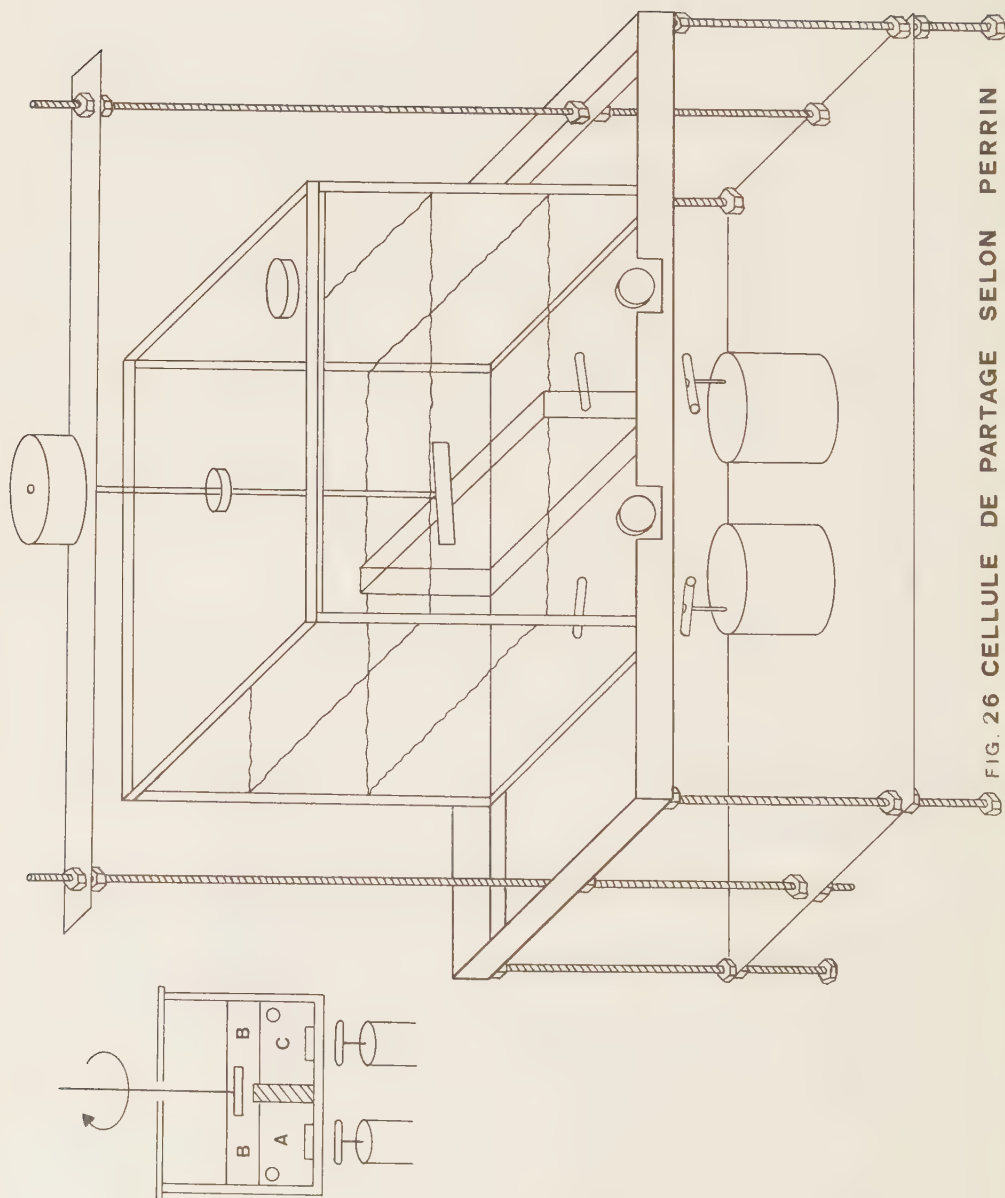


FIG. 26 CELLULE DE PARTAGE SELON PERRIN

Ce mode d'agitation permet une bonne homogénéisation des 3 phases liquides, tout en évitant les remous et la formation d'émulsion à l'interface. Seul un faible mouvement ondulatoire est perceptible à l'interface et à la surface de la phase organique.

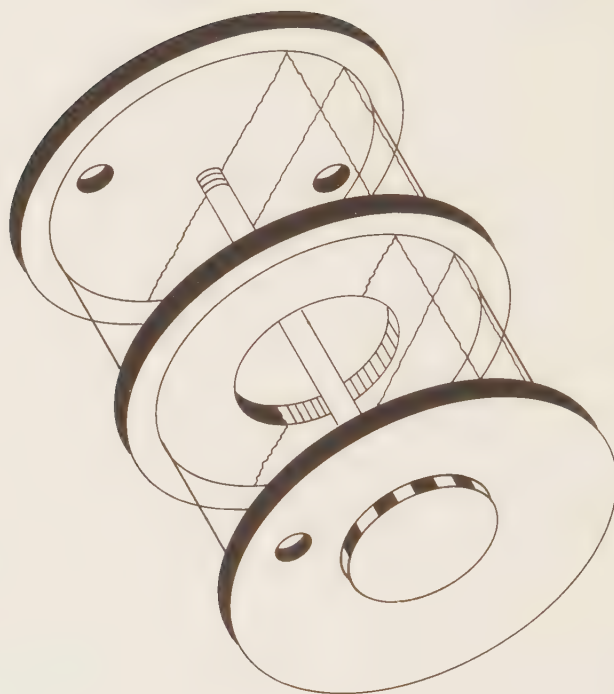
B. Modèle de Robertson¹¹⁴

Cette cellule de partage (fig. 27) est en principe un cylindre, tournant horizontalement sur des rouleaux, à vitesse constante. Les deux compartiments aqueux sont séparés par un disque dont l'ouverture centrale permet le passage du principe actif d'une phase à l'autre.

De nombreuses modifications ont été apportées au modèle original de *Robertson*, telles que la dimension de la cellule, les matériaux, le système de fixation et de montage. Les procédés de prélèvements des échantillons ont été perfectionnés. L'emploi du verre à la place du cuivre permet de voir ce qui se passe avec les trois phases (possibilité d'émulsion etc.).

Les deux pièces terminales ainsi que le disque central sont en Téflon^R et reliées contre les bords du cylindre en verre par des joints de silicone. La fixation de la cellule se fait au moyen d'une tige horizontale à vis, située au milieu de la cellule. Les échantillons sont prélevés à l'aide de seringues à travers des capuchons en caoutchouc.

FIG. 27 CELLULE DE PARTAGE
SELON ROBERTSON



III.4.3 Mode opératoire

A. Cellule de partage selon Perrin¹¹⁸

a) Préparation des phases liquides

La phase organique et les phases aqueuses sont respectivement saturées avec de l'eau et du n-octanol pendant 15 minutes dans des ampoules à décanter.

Les phases ainsi saturées sont équilibrées pendant environ 20 h à température ambiante. Une partie de la phase aqueuse saturée d'octanol est alors utilisée comme solvant pour la préparation des solutions.

La concentration initiale de la CAT dans A est de $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

b) Remplissage et mise en marche de la cellule

On introduit 350 ml de phase A (contenant la substance à étudier) et le même volume de phase C dans la cellule. On recouvre délicatement les deux phases aqueuses avec 500 ml de phase organique (présaturée avec de l'eau), puis on déclenche immédiatement l'agitation et le chronomètre (= temps zéro de l'expérience). L'ensemble est maintenu à température ambiante.

c) Prélèvements et dosage

Des prélèvements aqueux de 3 ml sont effectués à l'aide de seringues (munies d'aiguilles adéquates) à travers des capuchons en caoutchouc. Les prélèvements dans la phase organique se font au moyen d'une pipette par une ouverture dans le couvercle de la cellule. On dose les substances par spectrophotométrie dans l'U.V. Après les mesures, les échantillons

sont immédiatement remis dans la cellule, en évitant l'introduction de bulles d'air.

d) Dosage de la (+)-catéchine marquée au ^{14}C

Le recours à la (+)-catéchine marquée a été rendu nécessaire pour les expériences avec adjonction de lécithine dans la phase organique.

La concentration initiale de la phase A en ^{14}C -CAT est de $2,5 \times 10^{-4}$ M. On a prélevé respectivement des échantillons de 0,2 ml, 0,2 ml et 0,5 ml dans les phases A, B et C, que l'on introduit dans des flacons de comptage.

Les volumes prélevés ont été immédiatement complétés par les phases saturées correspondantes, pour que le rapport des volumes de la cellule de partage ne soit pas modifié. On a ajouté à ces prélèvements 10 ml de solution de scintillation (Instagel, Packard, Instr. Co), puis on a mesuré la radioactivité par scintillation liquide à l'aide d'un spectromètre Packard, Tri-Carb, modèle 2425, en effectuant des corrections dues au bruit de fond et au quenching.

Les c.p.m. obtenus ont été convertis en mg/ml, permettant de faire des comparaisons avec le produit non marqué, après s'être assuré que la variabilité, due à la différence des méthodes de dosage utilisées, n'est pas significative pour les expériences en absence de lécithine.

B. Cellule de partage selon Robertson¹¹⁴

La préparation des phases liquides et la concentration initiale de la CAT sont identiques à la méthode décrite ci-dessus. 150 ml de phase aqueuse (solution phase A) et 150 ml de phase

aqueuse C sont introduites dans les compartiments correspondants à l'aide d'un entonnoir muni d'un tuyau en polyéthylène. 300 ml de phase organique (phase B), sont ensuite versés doucement sur les phases aqueuses. On enclenche immédiatement le chronomètre et on met en marche l'agitation rotatoire. La cellule tourne sur les rouleaux à une vitesse de 10 t.p.m. La manière de prélever les échantillons en fonction du temps est identique à la méthode décrite ci-dessus.

III.5 Résultats et interprétation

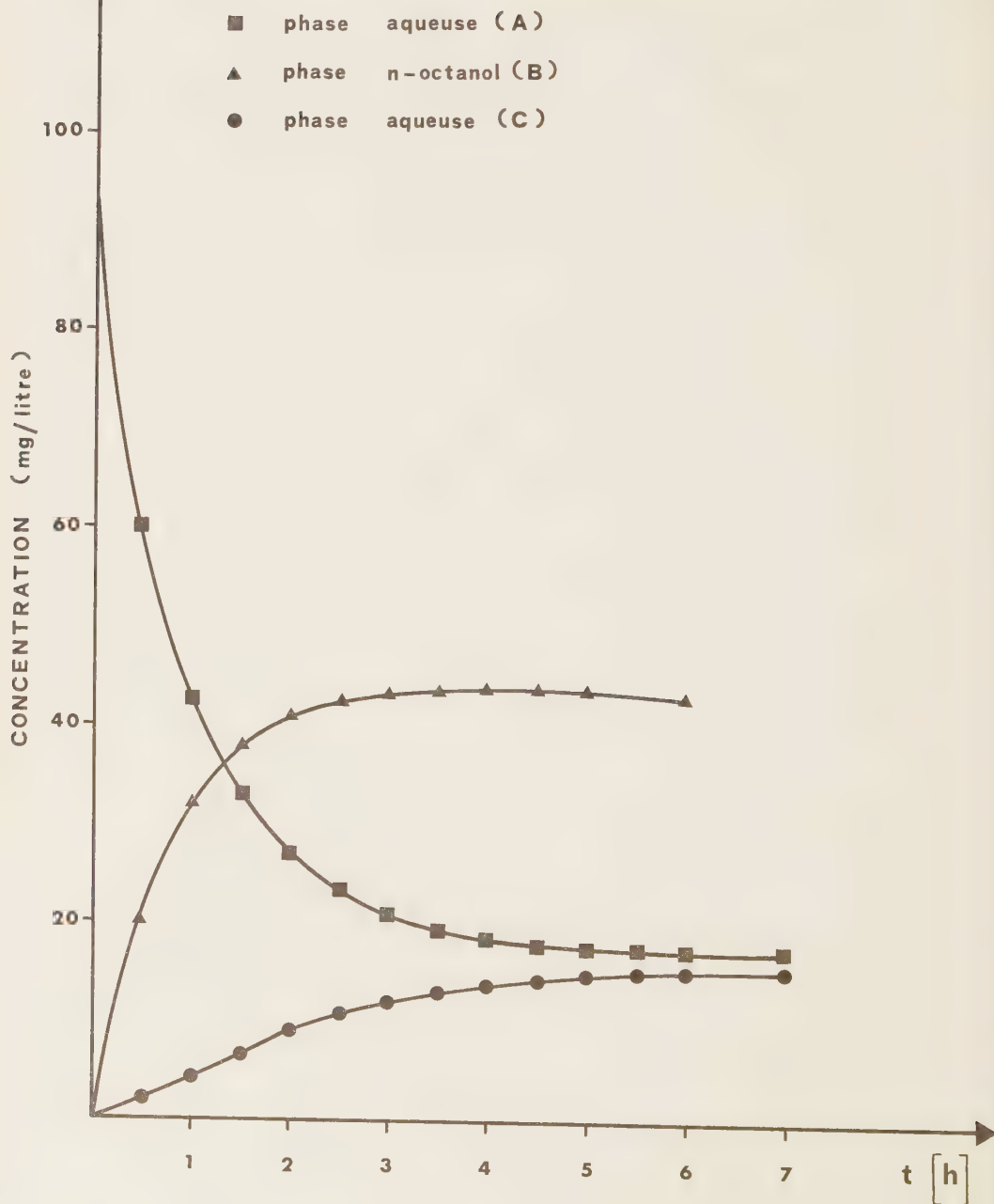
III.5.1 Vitesses de transfert de la CAT sans adjuvants

Les résultats du transfert de la CAT sont donnés par les courbes de la fig. 28 et les constantes de vitesse réunies dans le tabl. 11 (voir p. 112).

On constate une forte rétention du flavonoïde dans la phase B, due partiellement à la polarité du solvant qui, à son tour, affecte les constantes de vitesse caractérisant le transport du principe actif. L'accroissement important de la CAT dans la phase lipidique et son accumulation sont en opposition avec le concept classique d'absorption *in vivo* et réduit la validité du modèle. A cet inconvénient, on doit ajouter le rapport des volumes $V_A : V_B : V_C$ (respectivement 7: 10: 7 pour la cellule de partage selon Perrin), défavorable à une simulation d'une membrane biologique. En effet, si on veut se rapprocher des proportions biologiques, V_A devrait alors être assez petit, V_B très petit et V_C très grand.

FIG. 28 TRANSFERT DE LA CAT

(CELLULE DE PARTAGE SELON PERRIN)



L'octanol a une polarité relativement élevée (voir tabl. 10), favorisant cette accumulation dans la phase organique. On a volontairement évité de remplacer l'octanol par une phase moins polaire, car la valeur δ de l'octanol approche celle d'une membrane gastro-intestinale, qui devrait être voisine de $10^{110,125}$. De même, la faible teneur en eau de l'octanol saturé d'eau, apporte le léger caractère hydrophile qui existe également dans les membranes phospholipidiques biologiques.

*Schott*¹²⁶ a rapporté que la concentration de l'eau dans l'octanol saturé est de 2,3 M. Puisque la phase organique contient de l'eau, les molécules du soluté de cette phase sont en partie entourées de molécules d'eau. Ainsi, l'échange des molécules du solvant, se produisant au niveau de l'interface, est réduit; par conséquent, la vitesse de transfert à travers les phases saturées augmente¹²⁷.

La solubilité de la phase organique dans les deux phases aqueuses affecte également, dans une certaine mesure, les constantes de vitesse.

Grâce à la teneur en eau de la phase organique, on peut s'attendre à une ionisation partielle des molécules dans cette phase, ce qui permet de postuler que le coefficient de partage vrai est plus faible que celui obtenu expérimentalement; en d'autres termes, les rapports des constantes de vitesse apparentes k_1/k_{-1} et k_{-2}/k_2 de l'expérience sont légèrement trop élevés.

Selon *Fujita et coll.*¹²⁸, le facteur principal dominant la solubilité relative dans l'octanol est le pouvoir d'enchaînement par liaison hydrogène, ce qui est important pour les corps phénoliques.

Comme le montre la fig. 28, l'équilibre entre les phases aqueuses et la phase B s'établit environ 3 h après le début de l'expérience. Dès ce moment, la concentration en B est quasiment constante, signifiant que la disparition de la CAT en A est égale à l'apparition en C. L'équilibre s'établit en faveur de la phase organique, puisque, en accord avec les résultats obtenus avec les expériences préliminaires en ampoules à décanter (tabl. 1), 23% de la CAT restent dans la phase A, 57% dans B et 20% dans la phase C. Ces pourcentages à l'équilibre ont été calculés à partir des concentrations expérimentales dans les trois phases, considérant que la totalité, à la fin de l'expérience, correspond à 100%.

On a constaté que le bilan pondéral dans les trois phases décroît en fonction du temps; après 6 h, 16,8% de la concentration initiale ont apparemment "disparu" du système. Les courbes expérimentales de la phase A et C concordent fort bien avec celles données par l'ordinateur. Par contre, les échantillons de la phase B prélevés au-delà de 60 minutes, révèlent des concentrations légèrement supérieures aux valeurs théoriques. La concentration observée dans B à l'équilibre est d'environ 2 mg/l supérieure aux concentrations théoriques prévues.

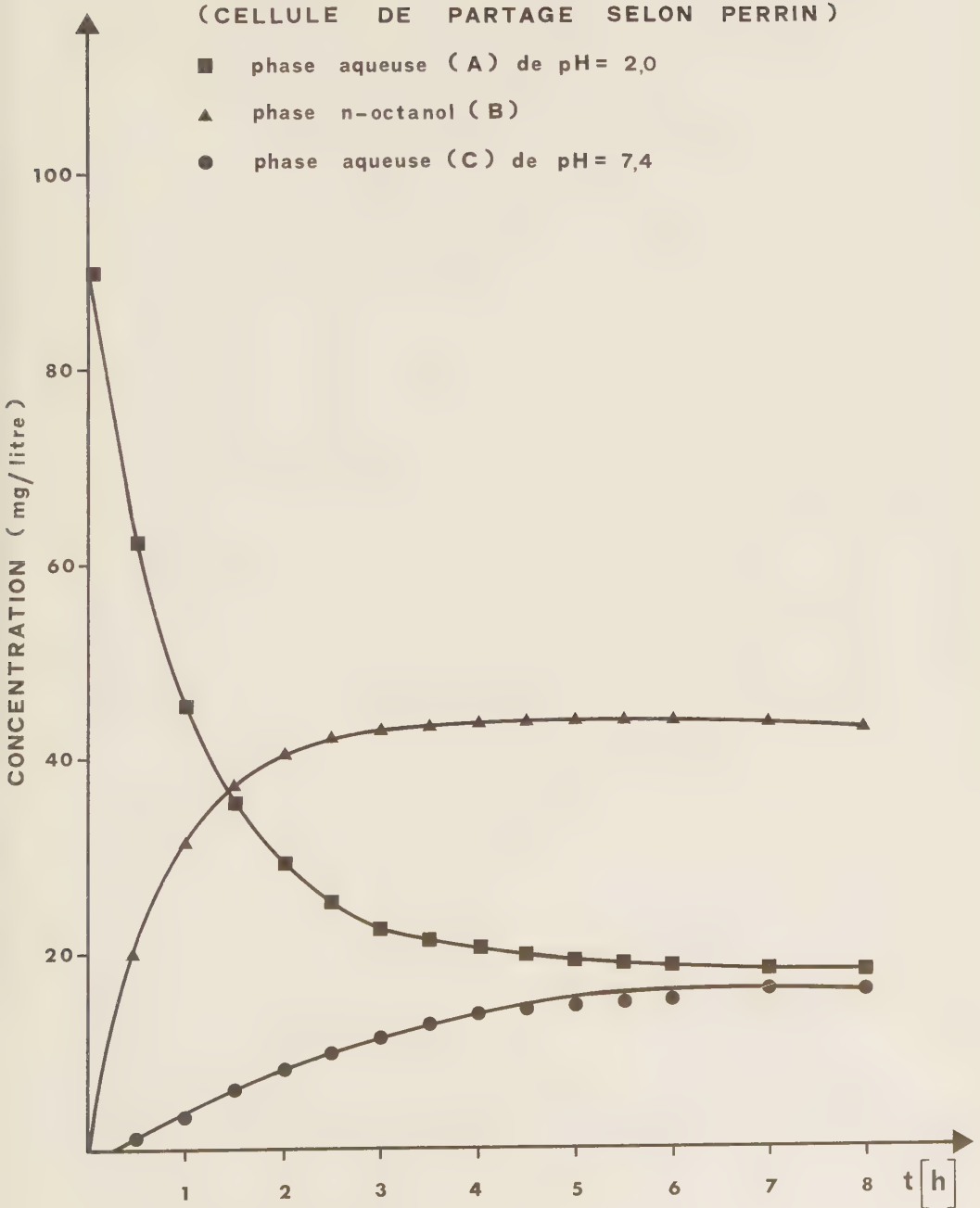
Ces deux observations sont explicables par des concentrations plus élevées au niveau de l'interface.

III.5.2 Influence des pH "physiologiques"

La fig. 29 représente l'absorption gastrique simulée, correspondant à la disparition de la CAT d'un compartiment

FIG.29 TRANSFERT DE LA CAT

(CELLULE DE PARTAGE SELON PERRIN)



gastrique de pH 2 et son apparition consécutive dans la membrane puis dans le plasma, représenté par une solution tampon de pH 7,4. Puisque les constantes de vitesse apparentes sont dépendantes du pH, un changement important de I (éq. 28) influence la vitesse de transfert de U. Si le pourcentage de principe actif non ionisé est élevé, la vitesse de transfert augmente.

A première vue, les courbes de transfert ne sont pratiquement pas modifiées par rapport aux expériences sans solution tampon.

Les constantes de vitesse apparentes (tabl. 11) révèlent cependant quelques différences : k_1 , k_2 et k_{-2} sont légèrement abaissés et la constante de vitesse du transfert de B en A est un peu plus élevée.

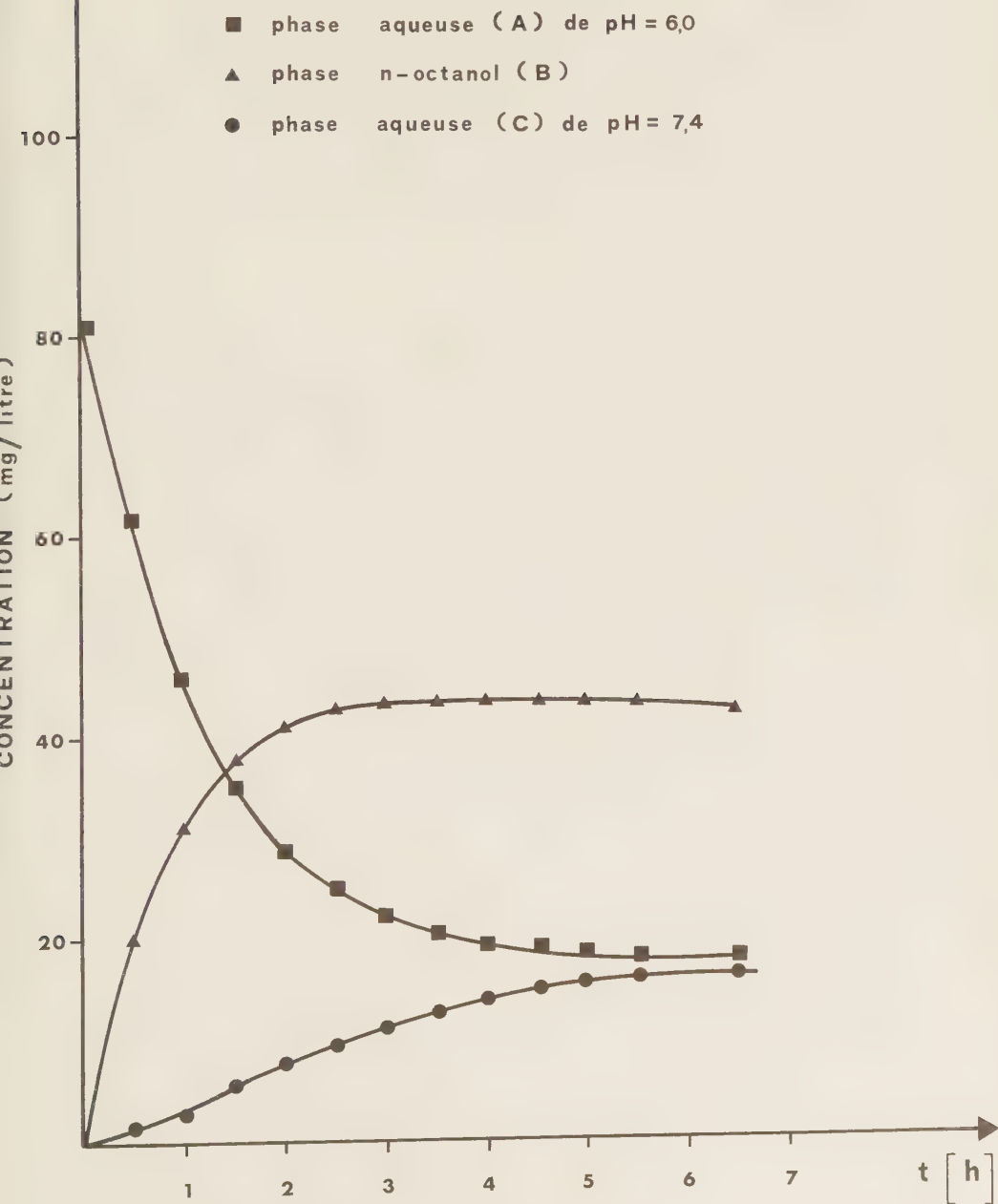
La diminution de k_1 n'est pas en accord avec la "pH-partition hypothesis", énoncée par Shore et coll.¹²⁹, mais peut s'expliquer par le fait, déjà cité, que la CAT est susceptible de se polymériser en milieu acide, modifiant ainsi ses propriétés de solubilité.

Une comparaison des constantes de vitesse k_{-1} et k_2 montre l'influence d'un pH acide et alcalin sur la vitesse de disparition du compartiment B. La distribution de la CAT est en faveur de la phase aqueuse acide et non de celle de pH 7,4, où la fraction ionisée augmente, réduisant de ce fait la vitesse de transfert de C en B.

En simulant l'absorption intestinale (fig. 30), on a utilisé une solution tampon de pH 6 comme phase A. Les constantes de vitesse apparentes se classent entre les constantes

FIG.30 TRANSFERT DE LA CAT

(CELLULE DE PARTAGE SELON PERRIN)



des expériences sans solution tampon et celles de l'absorption gastrique.

En résumant les effets du pH sur la vitesse de transfert de la CAT, on peut conclure qu'ils ne sont pas importants, ce qui confirme les résultats obtenus avec les membranes utilisées jusqu'à maintenant et décrites dans les première et deuxième parties de ce travail.

III.5.3 Influence de la CMC-Na

La courbe de transfert (fig. 31) de la CAT en présence de CMC-Na 0,5%, ajoutée à la phase A, montre que la vitesse de disparition de A ou la vitesse d'apparition dans B est freinée par l'adjuvant. La concentration de la phase A à la fin de l'expérience est significativement plus élevée que celle de la solution sans adjuvant. Par contre, la quantité finale transférée dans B et C n'est que peu influencée par la présence de l'adjuvant. Le temps nécessaire à l'établissement des équilibres est considérablement prolongé.

Les constantes de vitesse apparentes indiquent que la vitesse de transfert de A en B subit une diminution de l'ordre de 50% et que la constante inverse correspondante demeure pratiquement inchangée.

Puisque la quantité finale transférée dans C n'a pas été influencée par la présence de la macromolécule en A, les constantes contrôlant le transfert à travers l'interface B/C sont plus élevées.

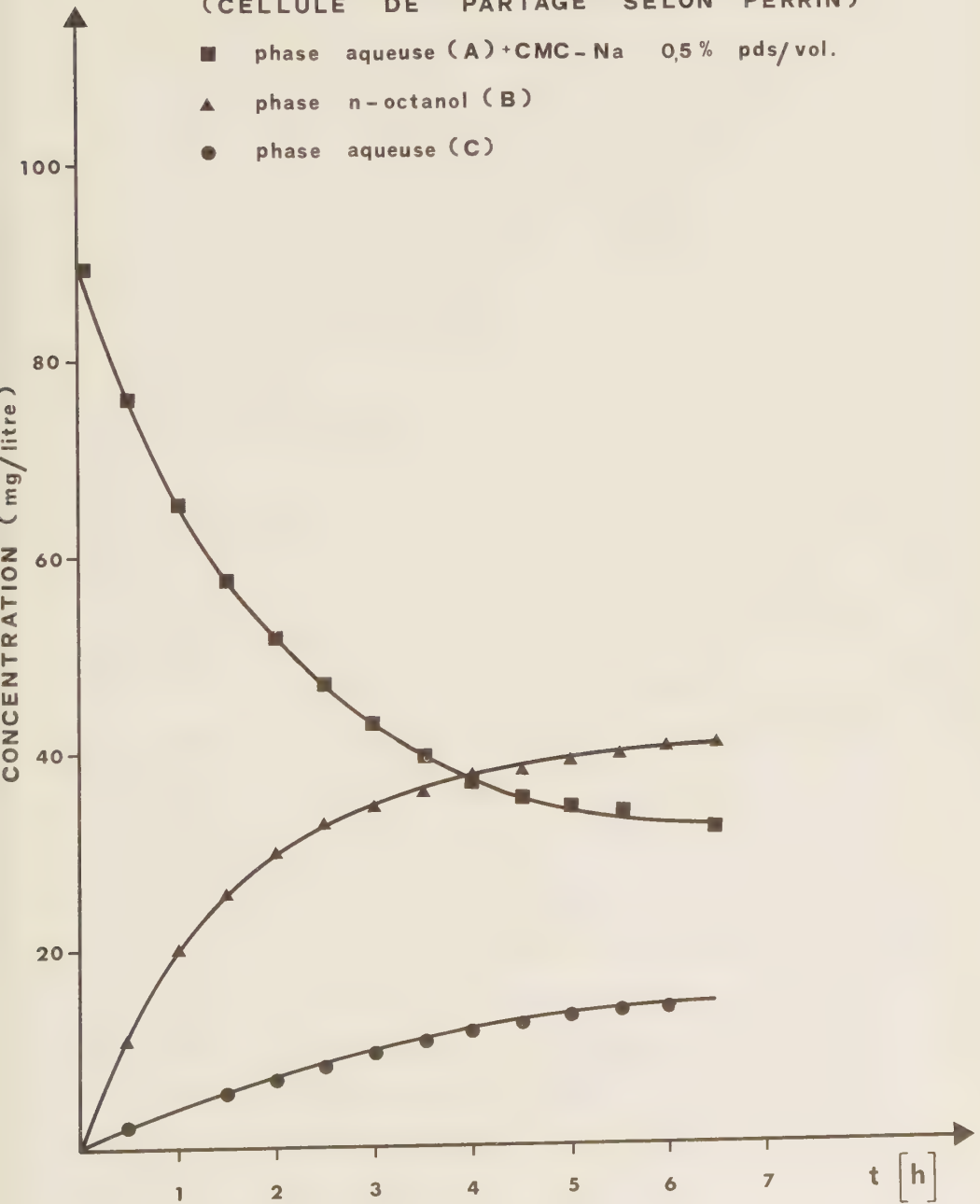
FIG 31 TRANSFERT DE LA CAT

(CELLULE DE PARTAGE SELON PERRIN)

■ phase aqueuse (A) + CMC - Na 0,5 % pds/vol.

▲ phase n-octanol (B)

● phase aqueuse (C)



Le coefficient de distribution k_{-2}/k_2 est pratiquement constant (3,97 pour les expériences sans CMC-Na et 4,19 pour les expériences avec l'adjuvant). Par contre, le coefficient de distribution k_1/k_{-1} n'est pas constant (3,47 pour les expériences sans adjuvant et 1,80 pour les expériences avec CMC-Na). L'abaissement de la vitesse de transfert de A en B peut être la conséquence de :

- l'augmentation de la viscosité en A, ralentissant le mouvement des molécules de CAT
- l'adsorption des macromolécules à l'interface A/B, ce qui modifie les propriétés interfaciales
- l'interaction du principe actif avec la macromolécule.

III.5.4 Influence de la lécithine

On a constaté que la lécithine, ajoutée à la phase B, se dégrade en fonction du temps et forme, par hydrolyse, des dérivés hydrosolubles (la lysolécithine, un produit d'hydrolyse partielle de la lécithine, est légèrement soluble dans l'eau). La présence de ces dérivés phospholipidiques, répartis dans les trois phases, a rendu impossible la méthode de dosage direct en U.V. Cette interférence se manifeste surtout à des concentrations de lécithine supérieures à 0,2%. De plus, on n'a pas voulu renoncer aux prélèvements dans les trois phases, qui permettent de mettre en évidence une éventuelle accumulation à l'interface. Pour cette raison, les essais avec adjonction de lécithine dans la phase organique ont été effectués avec la CAT marquée au ^{14}C .

La lécithine défavorise le transfert de la phase A à la phase B (fig. 32 et 33). L'abaissement de la vitesse de disparition de A est fonction de la concentration en lécithine.

Une adjonction de 1% de lécithine entraîne une concentration quasiment constante de CAT dans la phase organique après 3 h d'expérience. Cet état stationnaire en B favorise le passage en C, où la concentration augmente plus rapidement qu'avec une faible quantité de lécithine. La quantité qui arrive de A en B correspond à celle qui passe de B en C. La concentration maximum de la phase organique après 3 h correspond à un taux d'accumulation de 30%, ce qui est significativement inférieur à la valeur correspondante obtenue avec l'expérience sans lécithine (57%). Cette diminution du pouvoir d'accumulation de la phase B en présence de lécithine, revalorise la simulation d'une membrane biologique, car une forte rétention à ce niveau est contraire à la situation *in vivo*.

Les constantes de vitesse de l'expérience avec 0,2% de lécithine sont un indice d'un partage en faveur de la phase organique, mais montrent un abaissement significatif de toutes les vitesses par rapport aux expériences sans adjuvant.

Une phase organique, contenant 1% de lécithine, diminue l'affinité de cette phase pour les molécules de CAT. Les constantes de vitesse k_1 et k_{-1} se rapprochent. Le coefficient de distribution k_1/k_{-1} a significativement diminué; il n'est que légèrement supérieur à 1. Le passage à travers l'interface B/C est favorisé en direction de la phase aqueuse, puisqu'on trouve un coefficient de distribution k_{-2}/k_2 égal à 0,6.

FIG. 32 TRANSFERT DE LA CAT ¹⁴-C

(CELLULE DE PARTAGE SELON PERRIN)

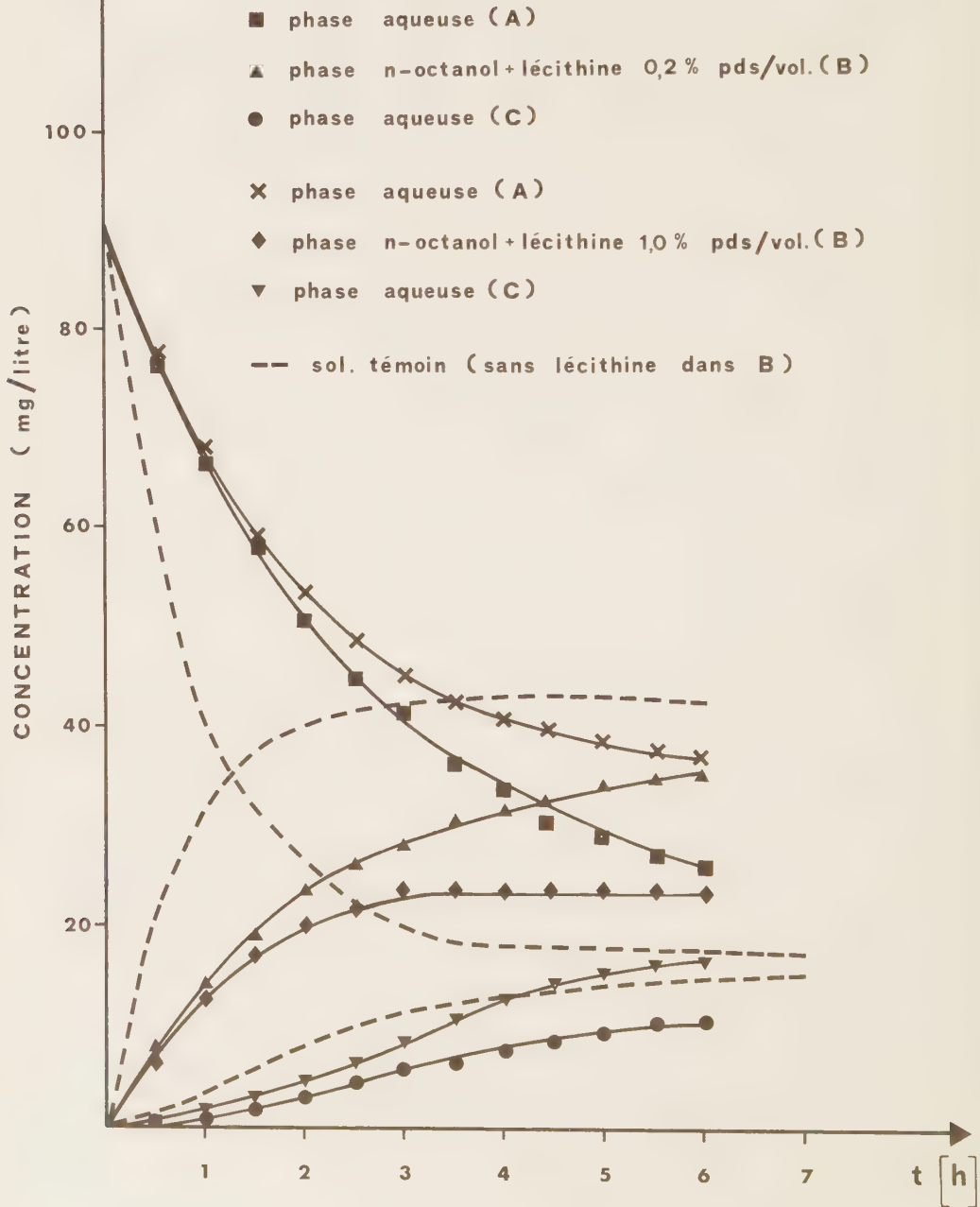
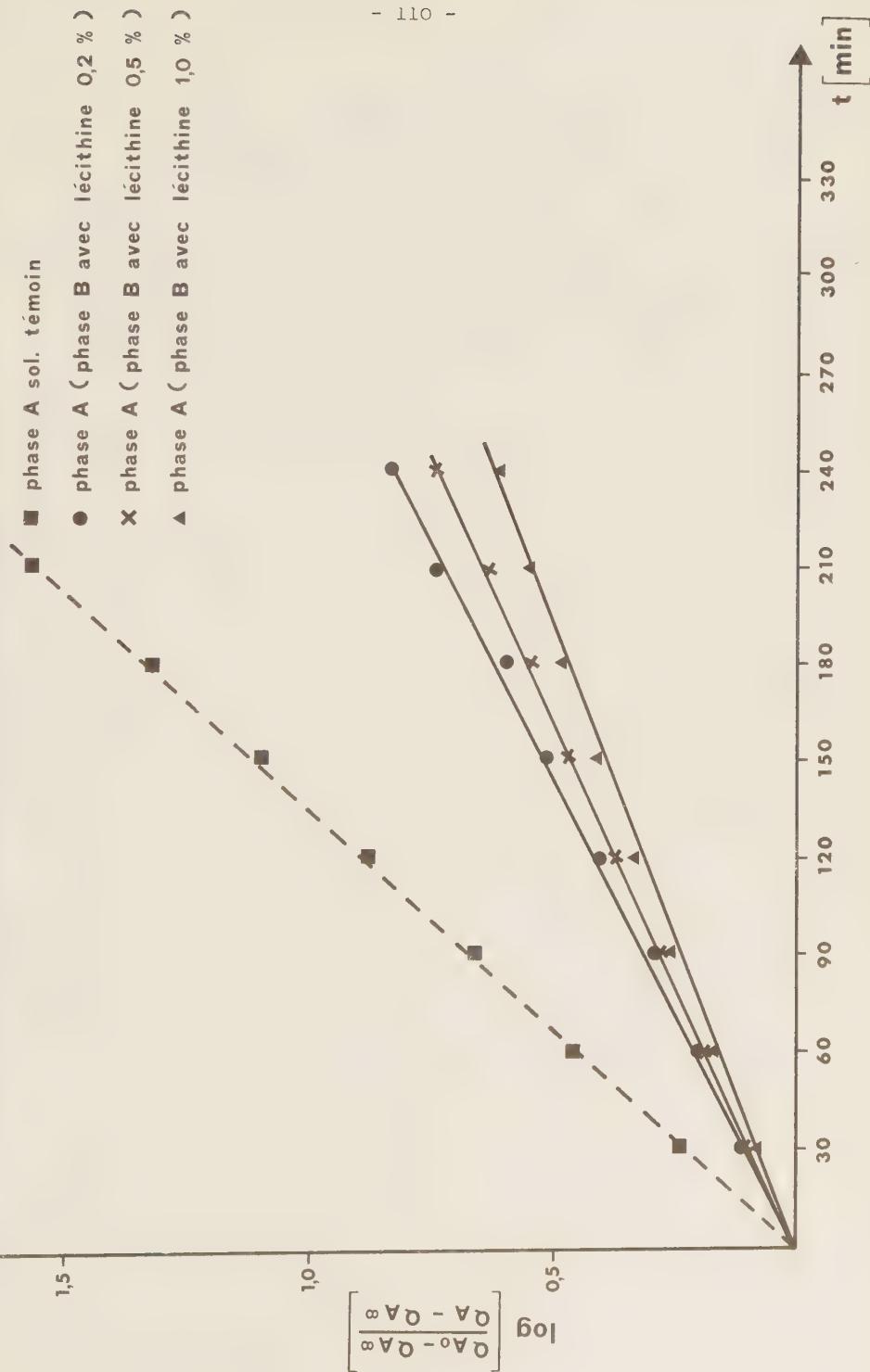


FIG. 33 VITESSE D'ETABLISSEMENT DE L'EQUILIBRE DU TRANSFERT DE LA CAT^{14}C
D'UNE PHASE AQUEUSE (A) A UNE PHASE ORGANIQUE (B)



Il est bien connu^{115,118} que la lécithine est orientée à l'interface lipide/eau avec sa partie polaire dirigée dans la phase aqueuse, formant une barrière interfaciale. Le passage est contrôlé par cette barrière, simulant ainsi de plus près les processus biologiques. On peut admettre que l'abaissement de la vitesse de transfert à travers cette membrane interfaciale est due à une résistance aux molécules pénétrantes. Ce passage n'est pas entièrement caractérisé par la diffusion, mais dépend aussi du pouvoir de pénétration à travers une barrière chargée électriquement.

Au cours de l'expérience, on a observé un léger trouble de la phase organique, ce qui est en accord avec les constatations de *Kitler et coll.*¹¹³. Ces auteurs ont attribué cette turbidité à une augmentation de la teneur en eau de la phase organique, davantage marquée en présence de lécithine. Les membranes biologiques contiennent une certaine quantité d'eau; l'eau répartie dans la membrane artificielle, contribue donc à simuler la composition d'une membrane biologique. Le degré de turbidité est dépendant de la concentration en lécithine. Puisque la CAT est plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, la présence de cette dernière dans la phase organique explique l'abaissement des constantes de vitesse et la rapidité avec laquelle la concentration de la phase organique, contenant 1% de lécithine, devient constante.

Tableau 11

Constantes de vitesse apparentes du transfert de la CAT à travers la phase organique (systèmes à trois phases)

Phase A	Phase B	Phase C	Constantes de vitesse apparentes $10^2 \text{ [min}^{-1}\text{]}$			
			k_1	k_{-1}	k_2	k_{-2}
$\xrightarrow{k_1}$ $\xleftarrow{k_{-1}}$	$\xrightarrow{k_2}$ $\xleftarrow{k_{-2}}$					
Eau distillée	n-octanol	eau distillée	1,457	0,420	0,325	1,292
pH = 2,0	n-octanol	pH = 7,4	1,405	0,433	0,270	1,000
pH = 6,0	n-octanol	pH = 7,4	1,421	0,432	0,287	1,019
CMC-Na 0,5%	n-octanol	eau distillée	0,751	0,416	1,498	6,284
Eau distillée	lécithine 0,2%	eau distillée	0,506	0,168	0,212	0,891
Eau distillée	lécithine 1,0%	eau distillée	0,490	0,396	0,227	0,145

III.5.5 Influence du dispositif de la cellule de partage

La conception générale de la cellule proposée par Robertson et coll.¹¹⁴ est semblable à celle de Perrin¹¹⁸, mais présente les modifications suivantes :

- les interfaces sont continuellement renouvelés, ce qui permet un échange accéléré du principe actif entre les différentes phases, sans mouvement ondulatoire au niveau de l'interface
- modification des rapports surface interfaciale/volume, obtenus par le calcul suivant :

$$\frac{S}{V_{aq}} = \frac{65,54}{150} = 0,437 \text{ [cm}^{-1}\text{]} \text{ ou encore}$$

$$\frac{S}{V_{org}} = \frac{65,54}{300} = 0,218 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$$

où S est la surface interfaciale $[\text{cm}^2]$ et V_{aq} , V_{org} respectivement les volumes de la phase aqueuse et de la phase organique $[\text{cm}^3]$.

Les calculs correspondant à la cellule de *Perrin* donnent :

$$\frac{S}{V_{aq}} = \frac{108}{350} = 0,308 \text{ [cm}^{-1}\text{]} \text{ ou encore}$$

$$\frac{S}{V_{org}} = \frac{108}{500} = 0,216 \text{ [cm}^{-1}\text{]}$$

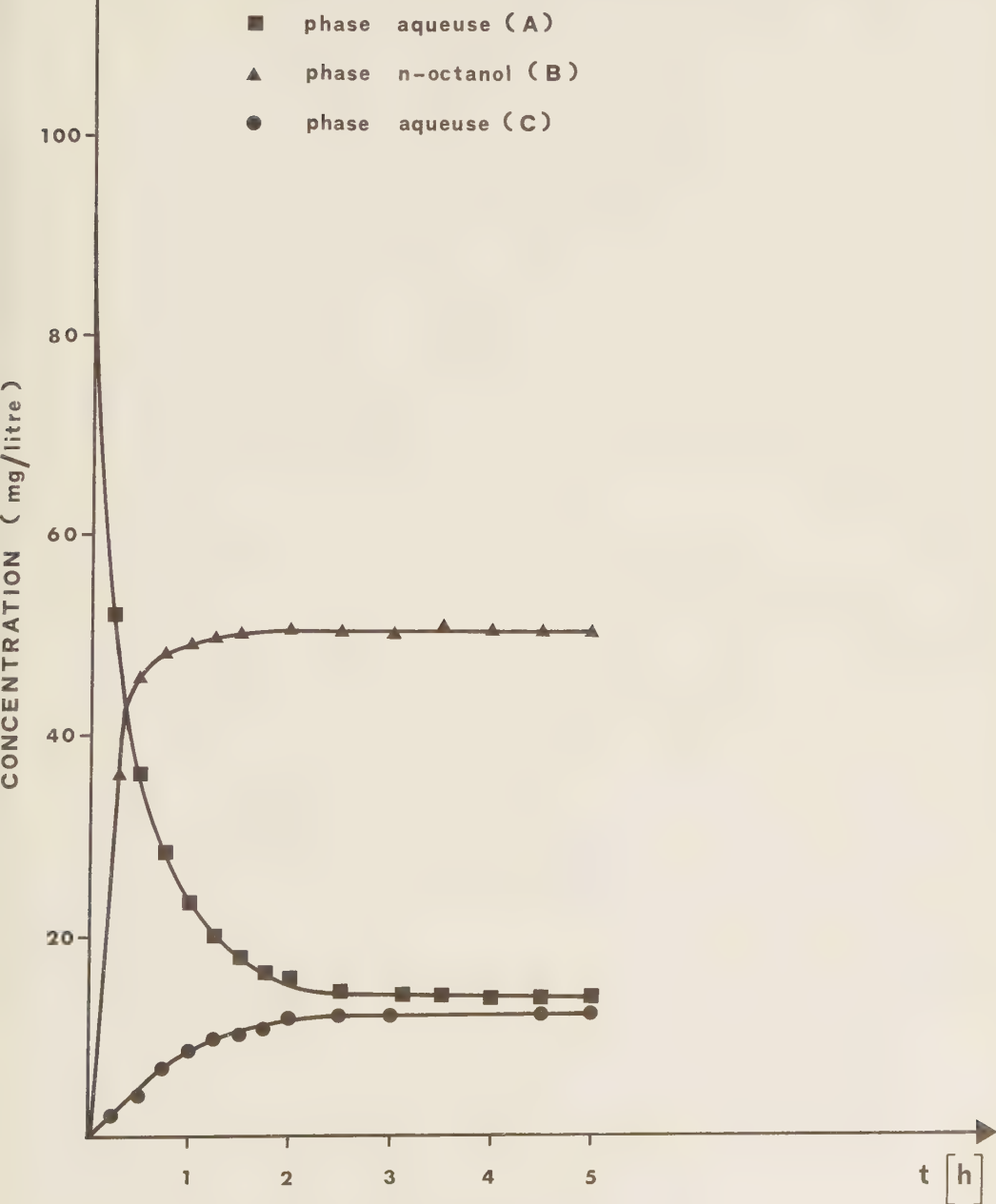
La fig. 34 montre une plus grande rapidité du transfert qu'avec le modèle précédemment décrit. La concentration dans la phase A est pratiquement constante après 2,5 h déjà, celle de la phase B après 1,5 h et celle de la phase C après 2 h.

A la fin de l'expérience, la CAT se répartit de la façon suivante : 18,2% dans la phase A, 65,8% dans la phase B et 16,0% dans la phase C. A titre de comparaison, la répartition à l'équilibre pour la cellule de *Perrin* est respectivement de 23%, 57% et 20%.

On n'a pas retrouvé non plus la totalité de la CAT après 3 h d'expérience; 15,5% de la concentration initiale

FIG. 34 TRANSFERT DE LA CAT

(CELLULE DE PARTAGE SELON ROBERTSON)



échappent au dosage, révélant une fois encore les propriétés interfaciales de la CAT, puisqu'une erreur expérimentale de dosage est exclue : en effet, pendant les 30 premières minutes de l'expérience, on a pratiquement retrouvé la totalité de la concentration initiale, répartie dans les trois phases.

Les phénomènes d'adsorption à l'interface solvant organique/eau sont dépendants du temps¹³⁰.

La disparition de la phase A peut être représentée linéairement (fig. 35), en considérant que le transfert est un processus de premier ordre. Une comparaison des pentes de la CAT montre que la vitesse de transfert étudiée avec la cellule de *Robertson* a pratiquement doublé par rapport au dispositif de *Perrin*.

Les constantes de vitesse apparentes, réunies dans le tabl. 12, sont significativement augmentées avec la cellule circulaire.

Khalil et coll.¹¹⁰ indiquent que les volumes, dans les équations 24-26 peuvent être négligés, puisque leur rapport est constant.

Doluisio et coll.¹⁰⁹ évitent d'introduire le volume dans les équations différentielles. Leurs équations montrent que la vitesse de transport dépend de la concentration dans chaque phase.

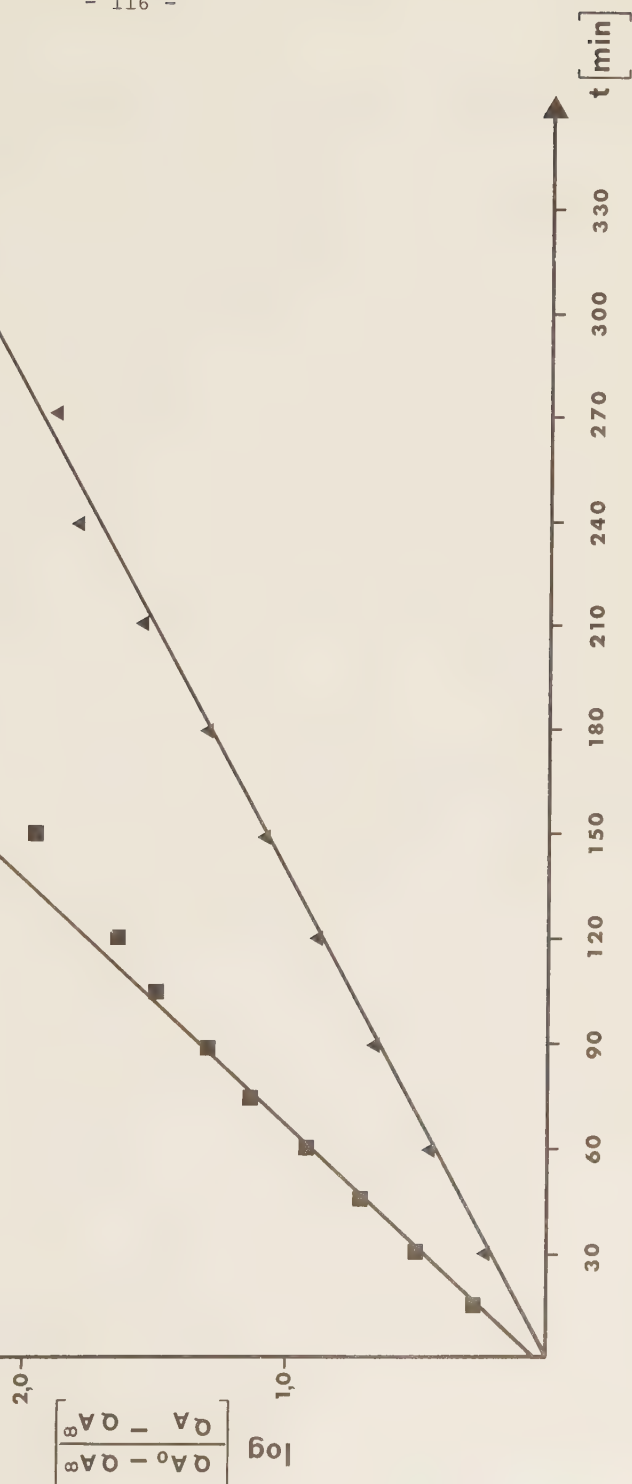
*Perrin*¹¹⁹, par contre, suggère l'introduction des volumes dans ces équations. Si on procède de cette manière, les constantes de vitesse sont indépendantes des volumes, mais

FIG. 35 COMPARAISON DE LA VITESSE D'ETABLISSEMENT DE L'EQUILIBRE DU
TRANSFERT DE LA CAT D'UNE PHASE AQUEUSE (A) A UNE PHASE
ORGANIQUE (B)

CELLULE DE PARTAGE

■ SELON ROBERTSON

▲ SELON PERRIN



dépendent uniquement du pH des solutions, du pK_a du principe actif, du coefficient de partage vrai et de la surface interfaciale. Les équations différentielles exprimées par *Khalil et coll.*¹¹⁰ et *Perrin*^{118,119} montrent que la vitesse de transfert des principes actifs est une fonction du volume multiplié par la concentration, c'est-à-dire une fonction de la masse.

*Yunker et coll.*¹²³, par contre, présentent des équations différentes. Les vitesses de transfert dans chaque phase, exprimées en masse, sont fonction de la concentration et de la surface interfaciale. Ces auteurs admettent, contrairement à ceux cités plus haut, qu'on devrait obtenir différentes valeurs pour les constantes de vitesse chaque fois que les volumes ont été changés.

Augustine et coll.^{120,121} ont montré que la composition de la phase lipidique, les conditions d'agitation, le rapport surface/volume et la température affectent les constantes de vitesse obtenues; il faut considérer la vitesse d'agitation ainsi que la dimension et la forme de l'agitateur.

Le rapport S/V_{aq} , calculé au début de ce chapitre, affecte les constantes de vitesse k_1 et k_{-2} , alors que S/V_{org} modifie les constantes de vitesse k_{-1} et k_2 , puisque les volumes des phases aqueuses sont identiques.

Tableau 12

Influence du rapport surface/volume et du dispositif du modèle sur le transport de la CAT

Cellule selon	Rapport $\frac{S}{V}_{aq}$ [cm ⁻¹]	Rapport $\frac{S}{V}_{org}$ [cm ⁻¹]	$k_1 \cdot 10^2$ [min ⁻¹]	$k_{-1} \cdot 10^2$ [min ⁻¹]	$k_2 \cdot 10^2$ [min ⁻¹]	$k_a \cdot 10^2$ [min ⁻¹]	$k_1 \cdot 10^2$ [cm min ⁻¹]	$k_{-1} \cdot 10^2$ [cm min ⁻¹]	$k_2 \cdot 10^2$ [cm min ⁻¹]	$k_{-2} \cdot 10^2$ [cm min ⁻¹]	$k'_a \cdot 10^2$ [cm min ⁻¹]
Perrin	0,308*	0,216*	1,457	0,420	0,325	1,292	4,71	1,94	1,50	4,19	1,06
Robertson	0,437	0,218	4,330	0,926	0,540	3,042	9,91	4,25	2,48	6,96	1,73

* Le rapport peut être légèrement supérieur, dû à l'interface faiblement ondulée

$$(a) \quad K_a = \frac{k_2(k_1/k_{-1})}{1+(k_1/k_{-1})}$$

$$(b) \quad K' = \text{constante de vitesse / rapport } S/V \text{ correspondant}$$

$$(c) \quad K'_a = \frac{k'_2(K'_1/K'_{-1})}{1+(K'_1/K'_{-1})}$$

Le tabl. 12 réunit les constantes de vitesse apparentes, k , calculées par l'ordinateur, sans autres modifications, les constantes de vitesse, K' , calculées en divisant les constantes de vitesse ci-dessus, k , par le rapport surface interfaciale/volume correspondant et les constantes d'absorption apparentes K_a exprimées par *Augustine et coll.*¹²¹ de la manière suivante :

$$K_a = \frac{k_2(k_1/k_{-1})}{1+(k_1/k_{-1})} \quad (31)$$

La constante K_a des expériences effectuées avec le modèle de *Robertson* est environ 76% plus élevée que celle de la cellule de *Perrin*.

La constante K'_a du modèle de *Robertson* obtenue en substituant dans l'équation 31 les constantes k par les constantes K' , est également plus élevée (63%) que celle de la cellule de *Perrin*.

Ces résultats montrent le rôle primordial joué par les conditions d'agitation (renouvellement en continu de l'interface, intensité d'agitation et épaisseur des couches de diffusion qui en résulte) et le phénomène secondaire dû aux différents rapports S/V .

L'ordre de rang des constantes de vitesse n'a pas été modifié, mais leur ordre de grandeur est significativement plus élevé pour la cellule de *Robertson*.

La diminution du temps d'obtention de l'équilibre entre les phases est due principalement à la différence du mode d'agitation. La cellule de *Robertson* a l'avantage de diminuer la

durée d'expérience mais présente, par contre, l'inconvénient de l'accumulation plus élevée de la CAT dans la phase organique. Ces résultats obtenus avec les deux modèles de transport *in vitro* mettent en évidence la difficulté à établir des corrélations entre les paramètres d'absorption *in vitro* et *in vivo* si un facteur tel que le mode d'agitation des différents compartiments, n'est pas exactement défini.

III.5.6 Vitesses de transfert du SEC-Na et du Tri-HR

Les transferts du SEC-Na et du Tri-HR ne se révélaient pas suffisamment rapides pour déterminer les calculs d'analyse compartimentale.

L'ajustement des courbes théoriques à celles de nos expériences s'est montré assez peu satisfaisant. Les courbes observées et théoriques, tracées par l'ordinateur, ne sont pas suffisamment rapprochées. Le SEC-Na dans l'eau est fortement hydraté, raison pour laquelle le transfert à travers l'interface eau/lipide conditionne un changement d'hydratation important. Cela nécessite une énergie d'activation pour arracher les molécules d'eau au niveau de l'interface.

QUATRIEME PARTIE

IV. Etude du transport des flavonoïdes à travers la paroi intestinale

Pour caractériser l'absorption intestinale d'un principe actif, un certain nombre d'expériences permet de déterminer la région intestinale où l'absorption est optimale, le mécanisme et la cinétique d'absorption, ainsi que les facteurs physico-chimiques et biologiques qui l'influencent.

Il est évident qu'une méthode expérimentale unique ne nous renseigne pas sur l'ensemble de ces données et qu'une information valable n'est obtenue qu'avec plusieurs méthodes complémentaires. Cette remarque justifie l'intérêt suscité par une comparaison de plusieurs techniques d'étude de l'absorption intestinale sur le même animal. Nous avons choisi pour ces diverses raisons deux méthodes expérimentales, l'une, *in vitro*, sur un fragment isolé d'intestin grêle du rat et l'autre, *in situ*, sur l'intestin intact du même animal maintenu en vie.

IV.1 Méthode d'absorption intestinale *in vitro*

IV.1.1 Généralités

La méthode du sac éversé de Wilson et Wiseman¹³¹ a été reprise ou plus ou moins modifiée par de nombreux auteurs pour étudier le transport actif de certains sucres¹³¹⁻¹³⁶, d'acides

aminés¹³⁷⁻¹⁴⁰, de dérivés de la pyrimidine^{141,142} et de sels biliaires^{66,143,144}. De plus, la technique du sac éversé a été utilisée pour étudier l'effet de différents facteurs sur l'absorption de principes actifs : pH¹⁴⁵, tensio-actifs non physiologiques¹⁴⁶, tensio-actifs physiologiques¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, formation de complexes¹⁵⁰⁻¹⁵⁴, hydrolyse enzymatique¹⁵⁵, formation de glucuronides¹⁵⁶ et potentiel électrique¹⁵⁷.

L'étude du transport à l'aide d'un tissu intestinal isolé présente certains inconvénients, à savoir que les segments excisés ne sont pas alimentés par la circulation sanguine et que leur viabilité dépend, dans une certaine mesure, de leur oxygénation artificielle. Par contre, cette méthode possède l'avantage d'éliminer les variables dues à la circulation sanguine et à d'autres processus biologiques ou physiologiques. Ainsi, un tissu isolé facilite l'étude de facteurs physico-chimiques qui peuvent être étudiés indépendamment des processus biologiques.

L'éversion permet d'exposer directement la muqueuse (active, grande surface) au milieu fortement oxygéné, puisque les cellules épithéliales exigent un apport en oxygène élevé. Cette méthode permet alors de prolonger la viabilité de la préparation intestinale, après son isolement de l'animal.

IV.1.2 Partie expérimentale

a) Préparation du sac éversé

L'absorption intestinale a été étudiée avec la méthode de l'intestin éversé développée par *Crane* et *Wilson*¹³⁶, permettant

d'effectuer des prélèvements d'échantillon en fonction du temps. Nous avons adopté cette méthode à notre tour en y apportant quelques modifications importantes.

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles d'environ 220 g de race Wistar^{*}. Les animaux sont maintenus à jeun pendant 20 à 24 h, mais reçoivent de l'eau ad libitum.

Le rat est anesthésié à l'éther puis la région abdominale est exposée par une incision médiane. L'intestin grêle tout entier est excisé dans sa partie supérieure immédiatement après le pylore et dans sa partie inférieure avant la jonction ileo-caecale, puis le mésentère est détaché délicatement le long de sa ligne d'attache à l'intestin. Celui-ci est immédiatement lavé trois fois dans des boîtes de Petri avec une solution physiologique glacée ($3-4^{\circ}\text{C}$), dont la composition est donnée dans le paragraphe suivant. La partie supérieure du segment est fixée à une seringue et le contenu du lumen est éliminé en le rinçant avec 5 fois 50 ml de solution physiologique glacée. Les premiers 15 cm de l'intestin sont rejetés, afin de s'assurer que la partie supérieure correspond à la région jéjunale. L'intestin est éversé au moyen d'une baguette en verre (diamètre 1,3 mm); cette éversion est facilitée par une ligature à une des extrémités. La basse température de la solution physiologique a été choisie de façon à ce que les processus biochimiques engagés soient ralentis pendant la préparation du sac.

Pendant toutes ces manipulations, l'intestin doit être oxygéné et constamment immergé dans la solution physiologique.

^{*} Elevage S. Ivanovas GmbH & Co., D-7964 Kisslegg (Allemagne).

La partie supérieure de l'intestin éversé est coupée en deux fragments successifs de 10 cm et chaque segment est fixé par trois fils à la canule du dispositif décrit par *Crane* et *Wilson*¹³⁶.

Chaque segment est étiré verticalement par un poids de 8 g afin de mesurer une longueur toujours constante. On fait trois ligatures à l'extrémité inférieure du fragment à une distance de 4 cm de la fixation supérieure. Chaque segment est introduit dans un tube contenant 10 ml de solution muqueuse (= solution physiologique contenant le principe actif) maintenue à 30° C et oxygénée continuellement avec un débit correspondant à 1 à 2 bulles par seconde (tube en téflon de 1,6 mm de diamètre intérieur), par un mélange de 95% d'oxygène et 5% d'anhydride carbonique; cette oxygénation de la solution muqueuse entraîne en même temps son agitation.

Après avoir introduit l'intestin éversé dans la solution muqueuse, le sac est rempli avec 1 ml de solution physiologique dépourvue de principe actif (= solution séreuse), chauffée préalablement à 30° C. Le laps de temps entre la dissection et la fixation des deux fragments aux canules ne dépasse jamais 20 minutes.

Toutes les 15 minutes, la totalité de la solution séreuse est prélevée à l'aide d'une seringue hypodermique munie d'un tuyau en polyéthylène. Après chaque prélèvement, l'intérieur du sac éversé est rincé deux fois avec 1 ml de solution physiologique; ces solutions de rinçages sont ajoutées au prélèvement pour le dosage. On remplace la quantité prélevée par 1 ml de

solution physiologique, jusqu'à la prise d'échantillon suivant. Pour chaque expérience, on effectue des prélèvements pendant 2 heures. Les fragments de tissus décelables à la fin de l'expérience dans la solution muqueuse révèlent une destruction partielle du tissu épithélial.

b) Préparation et contrôle des solutions

Comme solution physiologique, on a utilisé le tampon phosphate selon *Krebs*¹⁵⁸, sans calcium. La concentration initiale dans la solution muqueuse, pour tous les principes actifs étudiés, est égale à 2 mg/ml. Le pH des solutions, ajusté à 6,0 avec de l'acide chlorhydrique 1N, a été choisi en raison de la stabilité des dérivés dans ce milieu légèrement acide. Le pH de toutes les solutions bien oxygénées a été déterminé avant et immédiatement après chaque expérience et ne varie que dans un intervalle de 6,00 $\pm$ 0,20. Etant donné que la composition des solutions muqueuse et séreuse est identique, à l'exception de la présence en principe actif, le gradient électrochimique ou osmotique entre ces deux solutions est négligeable.

Le volume important de la solution muqueuse et le maintien de "sink conditions" par un échantillonnage fréquent et un remplacement total de la solution séreuse assure un gradient de concentration quasiment constant (la concentration séreuse, par exemple, ne dépasse jamais 15% de la concentration muqueuse, à l'exception de l'expérience : SEC-Na + taurocholate-Na 3%, où le pourcentage s'élève à 27%).

Etant donné que la solution muqueuse a une concentration et un volume importants, la quantité totale des flavonoïdes, initialement présente dans la solution muqueuse, est transférée à un taux inférieur à 8%, à l'exception du cas cité ci-dessus, dans la solution séreuse en l'espace de deux heures. C'est la raison pour laquelle on peut postuler que le flux inverse de principe actif provenant du compartiment récepteur et se dirigeant vers le compartiment muqueux est négligeable et que la concentration muqueuse est quasiment constante pendant la durée de l'expérience.

c) Dosage

Les prélèvements séreux combinés au liquide de lavage sont complétés à 20 ml avec la solution physiologique.

Après filtration de la solution sur Millipore^R (support-filtre Swinnex-25 avec filtre type HA 0,45 μ), la solution limpide obtenue est dosée directement par spectrophotométrie, dans les conditions déjà décrites. Les composants de la solution de référence n'interfèrent pas avec le dosage du principe actif.

d) Evaluation des résultats

La détermination répétée de la vitesse de transfert dans nos conditions expérimentales, n'a révélé aucune différence significative entre le premier et le deuxième segments. On n'a donc fait aucune distinction entre ces deux segments dans le traitement des résultats.

Chaque expérience a été effectuée au moins trois fois et la moyenne de la quantité cumulée dans la solution séreuse a été calculée sur un minimum de trois animaux. Toutes les expériences dont les sacs ont révélé le moindre défaut d'étanchéité, ont été écartées. La bonne étanchéité des sacs est contrôlée à la fin des expériences, en tamponnant délicatement avec du papier filtre le côté muqueux du sac qui contient encore la solution séreuse.

e) Mode de transport

Des fragments d'intestin grêle, représentant chacun un quart de la longueur totale, sont éversés, puis les sacs sont préparés selon la méthode décrite ci-dessus. Les flavonoïdes sont ajoutés initialement en concentration égale à l'intérieur et à l'extérieur du sac ($1,5 \times 10^{-3}$ M et $5,0 \times 10^{-4}$ M respectivement pour les catéchines et le Tri-HR). La solution physiologique contient en plus 200 mg% de glucose. L'incubation, réalisée à une température de 37° C, dure 1 heure.

Les expériences concernant le mode de transport ont été effectuées deux fois, sur des animaux différents.

*f) Adjonction de taurocholate-Na, dioctyl sulfosuccinate-Na
et CMC-Na*

Pour étudier l'influence des adjuvants, nous avons toujours effectué des séries de deux essais en parallèle avec deux segments intestinaux du même animal; le premier, sans adjuvant

dans la solution muqueuse, sert de témoin alors que le deuxième met en évidence les caractéristiques de perméabilité en présence d'agents tensio-actifs et viscosifiants. La CMC-Na et le dioctyl sulfosuccinate-Na ne sont pas transférés dans le compartiment récepteur pendant la durée de l'expérience. Le principe actif en présence de la faible quantité de taurocholate-Na dans la solution séreuse a été dosé en utilisant la méthode spectrophotométrique à deux composants, précédemment décrite dans la première partie de ce travail.

g) Nature des cations de la solution physiologique

Le tampon $-K^+$ est préparé en substituant quantitativement les sels de sodium du tampon- Na^+ de référence, utilisé jusqu'ici, par les sels de potassium correspondants, en maintenant la composition des anions.

h) Temps d'incubation

Après sa fixation à la canule, le sac éversé est incubé dans la solution physiologique dépourvue de principes actifs, respectivement pendant des périodes de 30, 60 et 90 minutes. Pendant ces temps d'incubation, on a fait des prélèvements fictifs de la solution séreuse toutes les 15 minutes, que l'on a rejetés. Après chaque incubation, le sac, toujours fixé à la canule et vidé de la solution physiologique, est transféré immédiatement dans une autre solution muqueuse contenant le principe actif; après introduction de 1 ml de solution séreuse (correspondant au temps zéro), on prélève celle-ci toutes les 15 minutes pendant

respectivement 90, 60 et 30 minutes.

i) Influence de la musculature sur le transport in vitro

L'intestin grêle est lavé avec une solution tampon phosphate ne contenant ni ions magnésium ni calcium. Le pH de cette solution physiologique glacée a une valeur mesurée de 7,2.

Les premiers 20 cm de l'intestin éversé sont divisés en deux segments égaux, correspondant respectivement aux segments 1 et 2.

Segment 1 :

L'intestin éversé est conservé pendant 45 minutes dans 30 ml de tampon phosphate glacé (sans Ca^{2+} et Mg^{2+} , pH = 7,2) contenant de l'acide éthylène-diamine-tétracétique 0,1 M (EDTA 0,1 M). Le pH de cette solution tampon est ajusté à 7,4 avec de la soude caustique 1 N.

Segment 2 :

Le segment 2 est incubé, simultanément au segment 1, pendant 45 minutes dans 30 ml de tampon phosphate glacé (sans Ca^{2+} , Mg^{2+} et EDTA; pH = 7,2), sous oxygénation continue.

A la fin de cette période, l'épithélium du segment 1, déjà en grande partie détérioré, a été totalement détaché de la paroi en frottant délicatement cette dernière avec le doigt sur toute la longueur de l'intestin éversé. Puis, le segment 1 a été lavé successivement dans trois boîtes de Pétri contenant le tampon phosphate selon *Krebs* (avec Mg^{2+} , pH = 7,2), pendant 5 minutes.

Après lavage simultané de l'intérieur des deux segments avec 3 fois 50 ml de tampon phosphate glacé et fixation des deux fragments aux canules, l'expérience est réalisée selon le procédé habituel.

IV.1.3 Résultats et interprétation

A. Mode de transport

La plupart des principes actifs sont absorbés par le tractus digestif selon le processus de diffusion passive; en effet, les molécules du principe actif diffusent d'une région de concentration élevée (fluide gastro-intestinal) vers un niveau de concentration faible (sang). Conformément à la première loi de Fick, la vitesse de diffusion est proportionnelle au gradient de concentration à travers la membrane gastro-intestinale.

Le transport actif, par contre, est un processus selon lequel le principe actif est susceptible d'être transporté contre un gradient de concentration ou gradient électrochimique.

Citons quelques autres propriétés caractéristiques des processus d'un transport actif :

- a) les systèmes de transport se saturent à concentrations élevées en principe actif (cinétiques de saturation)
- b) le transport actif montre une spécificité pour une catégorie de substances de structure chimique déterminée
- c) des substances transportées par un mode actif sont normalement absorbées à un site spécifique, localisé dans un segment limité de l'intestin grêle

- d) si deux substances de structure similaire sont transportées par le même "carrier", l'une inhibera le transport de l'autre par compétition
- e) le mécanisme de transport est inhibé par des substances interférant avec le métabolisme cellulaire (inhibiteurs métaboliques).

L'étude d'un transport actif est simplifiée par des préparations *in vitro* permettant de contrôler la composition des solutions des deux côtés de la barrière intestinale. La méthode du sac éversé convient parfaitement à cette investigation¹³¹ puisque :

- a) l'éversion expose la muqueuse à une solution bien oxygénée
- b) la distension augmente la surface du sac et réduit l'épaisseur de la barrière
- c) le petit volume à l'intérieur du sac permet de déceler des changements importants de la concentration, même si de petites quantités de principe actif sont transférées. Cette condition expérimentale est un avantage essentiel pour doser, avec précision, une substance transportée activement
- d) un certain nombre de fragments adjacents de l'intestin du même animal peut être étudié simultanément; des segments adjacents peuvent présenter différentes vitesses de transport actif.

Si on introduit initialement des solutions de concentrations égales en principe actif des deux côtés du tissu

intestinal, une concentration élevée dans le compartiment séreux après 1 heure, dépendant de l'énergie métabolique, révèle un transport actif. Par conséquent, si le rapport des concentrations séreuse et muqueuse atteint, à la fin de la période d'incubation, une valeur supérieure à 1,0, on parvient à la conclusion que le transport *in vitro* de la substance testée est actif.

Les figures 36-38 représentent le mode de transport de la CAT, du SEC-Na et du Tri-HR au niveau des différents segments de l'intestin grêle. Les zones hachurées 1-4 représentent l'activité dans les quatre quarts subséquents de l'intestin grêle, avec indication de l'écart-type de la moyenne de deux rats. Les rapports de concentration sont voisins de 1,0 et ne diffèrent pas significativement d'un segment à l'autre.

Ces résultats ne sont pas dus à une saturation d'un éventuel transporteur, puisqu'on se trouve en présence de très faibles concentrations.

On peut conclure que ces flavonoïdes ne sont pas transportés contre un gradient de concentration à travers l'intestin grêle, *in vitro*; leur mode de transport est donc passif.

B. Transport passif en fonction du temps

Les quantités cumulées de principe actif transféré en fonction du temps par unité de concentration muqueuse sont réunies dans le tableau 13 et exprimées graphiquement (fig. 39).

FIG.36 ABSORPTION INTESTINALE (SAC EVERSE)
MODE DE TRANSPORT DE LA CAT ($1,5 \cdot 10^{-3} m$)

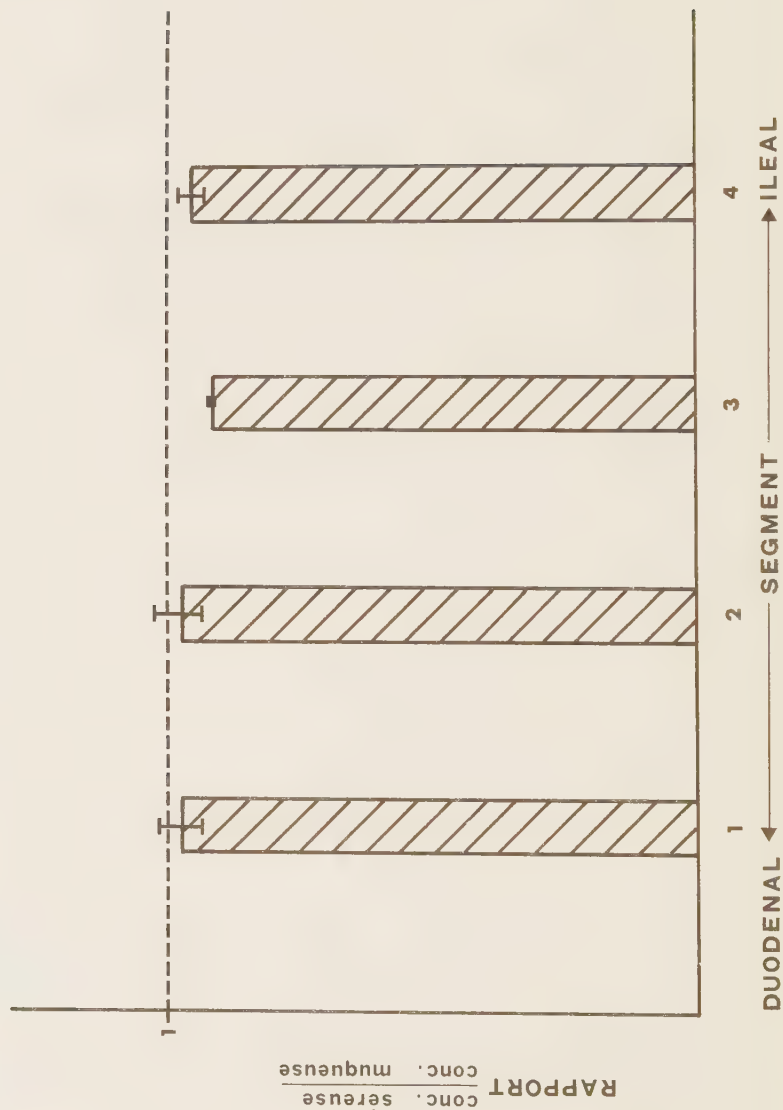


FIG. 37 ABSORPTION INTESTINALE (SAC EVERSE)
MODE DE TRANSPORT DU SEC - Na ($1,5 \cdot 10^{-3}$ m)

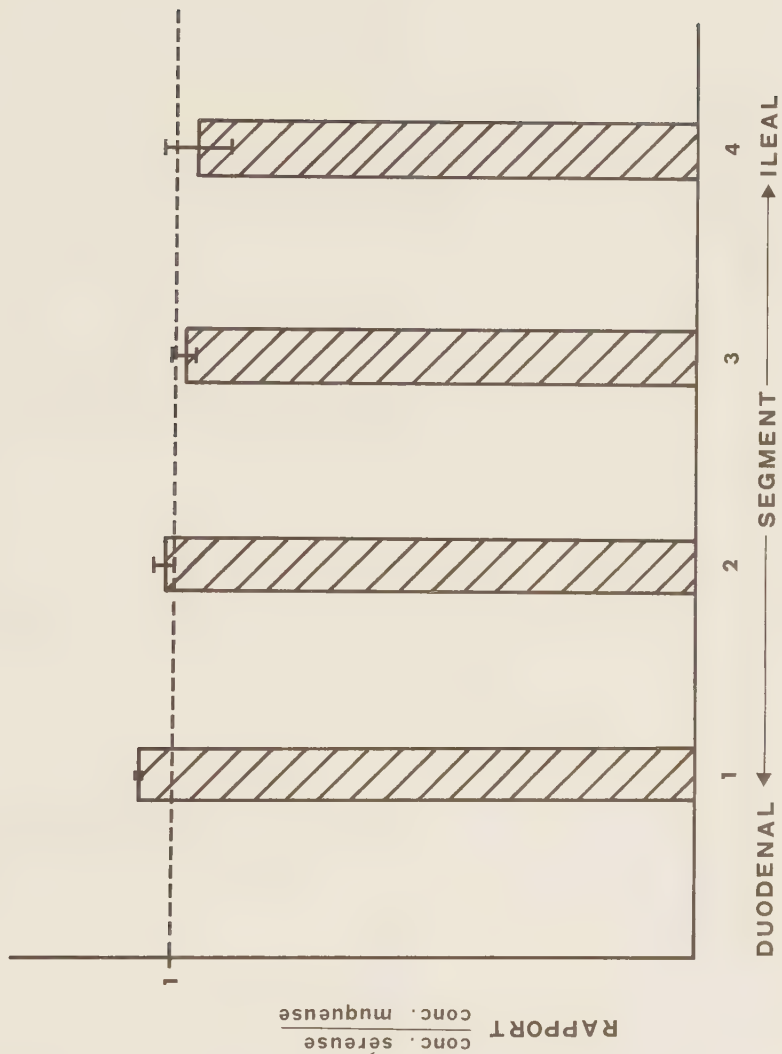
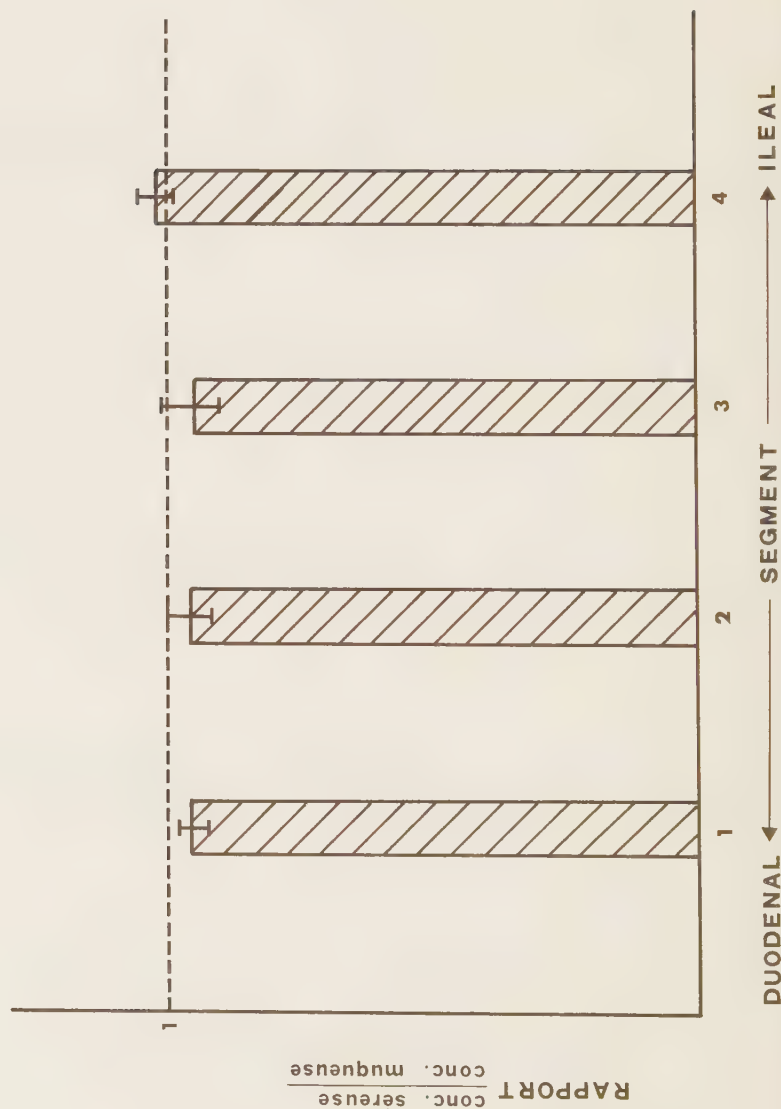


FIG. 38 ABSORPTION INTESTINALE (SAC EVERSE)
MODE DE TRANSPORT DU Tri-HR (5×10^{-4} m)



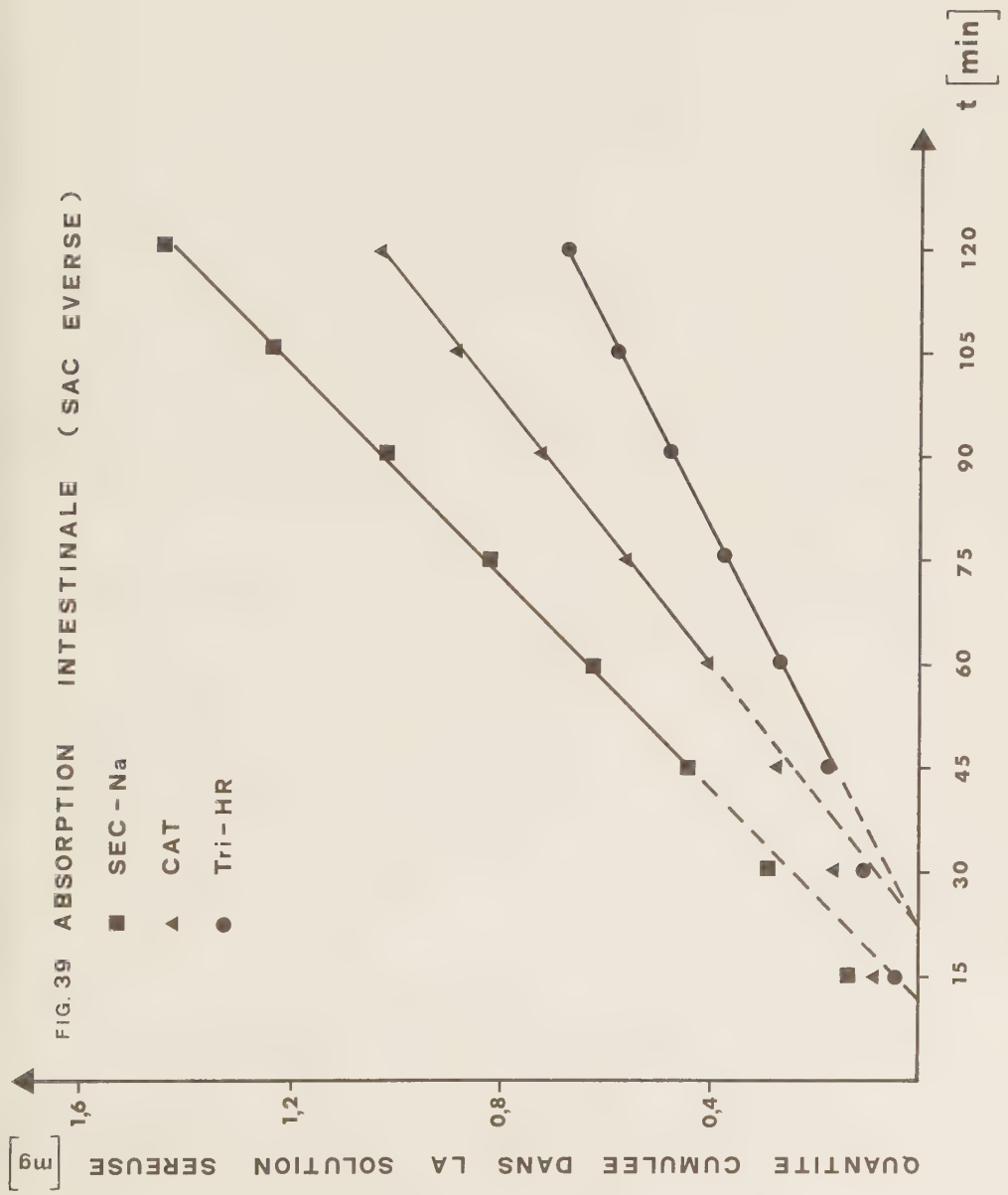


Tableau 13

Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat en fonction du temps de trois dérivés flavoniques, temps de latence (L) et valeurs de clearance

Dérivés	Minutes								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [mlxmin ⁻¹]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
CAT	0,085 (+0,007)	0,166 (+0,010)	0,273 (+0,014)	0,399 (+0,018)	0,561 (+0,015)	0,728 (+0,015)	0,904 (+0,018)	1,052 (+0,021)	23	3,33 (+0,14)
SEC-Na	0,148 (+0,004)	0,283 (+0,002)	0,447 (+0,013)	0,631 (+0,021)	0,832 (+0,033)	1,034 (+0,048)	1,255 (+0,067)	1,472 (+0,064)	12	5,25 (+0,17)
Tri-HR	0,045 (+0,003)	0,102 (+0,002)	0,177 (+0,008)	0,261 (+0,007)	0,370 (+0,011)	0,477 (+0,025)	0,587 (+0,022)	0,692 (+0,025)	22	2,18 (+0,00)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne d'au moins trois expériences.

Le paramètre de perméabilité est déterminé pour chaque dérivé par rapport à son temps de latence, abscisse à l'origine après extrapolation de la portion linéaire, et à sa clearance, quantité cumulée du principe actif transféré en 60 minutes par rapport à la concentration muqueuse qui est constante :

$$\text{clearance [ml/min]} = \frac{\text{quantité transférée en 60 min}}{\text{concentration muqueuse en principe actif} \times 60} \quad (32)$$

Les points de la portion linéaire de la courbe (fig. 39) représentent le transfert après l'établissement d'un état quasi-stationnaire. Le rapport de transfert (= vitesse de transfert/concentration muqueuse) augmente en fonction du temps jusqu'à ce que le régime constant soit établi. L'ordre de rang de la vitesse de transfert des trois dérivés est le suivant : SEC-Na > CAT > Tri-HR.

Si l'on admet un transport passif et considère l'épithélium intestinal comme une membrane inerte, lipidique, aisément pénétrable par des molécules liposolubles non-dissociées et difficilement par des molécules ou ions non liposolubles, alors l'ordre de rang de la vitesse de transport devrait être identique aux expériences obtenues avec les membranes liquides, c'est-à-dire CAT > Tri-HR > SEC-Na.

Il existe, dans la littérature, un grand nombre d'études montrant des différences importantes entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux basés sur l'hypothèse de partage en fonction du pH des expériences *in vivo*.

Nogami et coll.¹⁵⁹ conclurent que les formes non dissociées ainsi que les formes dissociées de l'acide salicylique sont transférées *in vitro* (méthode de perfusion) à travers la

barrière intestinale. Ces auteurs ont calculé le rapport P_u/P_i des coefficients de perméabilité de l'acide salicylique sous forme non ionisée et ionisée, et ont trouvé une valeur égale à 6.

Par contre, le même rapport des coefficients de perméabilité des essais *in vivo*, basé sur l'hypothèse de "diffusion non ionique" de *Hogben et coll.*¹⁶⁰, s'élève à 4500 et montre que la forme dissociée n'est pratiquement pas absorbée.

*Kakemi et coll.*¹⁶¹ ont pu mettre en évidence que le processus de fixation à la muqueuse, pour quelques principes actifs, est un facteur important de l'absorption intestinale et que ce processus explique les différences de la "pH-partition hypothesis". L'absorption *in vitro* de la forme ionisée a pu être interprétée par ce facteur de fixation : la forme ionisée du principe actif est adsorbée à la surface muqueuse et cette interaction fait augmenter la concentration du principe actif à la surface de la membrane qui, à son tour, favorise le passage en direction du compartiment séreux.

*Turner et coll.*¹⁶² ont mentionné que les principes actifs ionisés montrent une différence des coefficients de perméabilité directionnelle *in vitro*. Le transfert, orienté du compartiment muqueux vers le compartiment séreux, des dérivés ionisés, se produit à une vitesse environ 1,3 fois plus élevée que le passage inverse. Cette différence n'a pas pu être observée pour des principes actifs non ionisés.

Le transfert relativement rapide du SEC-Na à travers l'intestin éversé peut être expliqué par le fait d'une altération

structurale de l'intestin. Le sac éversé est dépourvu de mésentère; par conséquent, les canaux lymphatiques responsables de l'élimination du fluide sont absents et cette déficience provoque une accumulation d'eau dans l'intestin¹⁶³ favorisant à son tour le passage d'un dérivé hydrosoluble.

Il est même possible de suggérer le phénomène suivant : une quantité de SEC^- (anion du SEC-Na) est transformée, selon l'équation d'hydrolyse, au site d'absorption en SEC-H (non dissocié) pendant le transfert ionique existant entre les fluides extracellulaires et intracellulaires. Puisque les deux formes, SEC^- et SEC-H , sont vraisemblablement absorbées indépendamment *in vitro*, les ions par la voie aqueuse des espaces intercellulaires et les molécules non dissociées par la voie lipidique représentée par les cellules, on pourrait en déduire que la totalité de la quantité transférée est la somme des quantités absorbées par l'une et l'autre des deux voies possibles.

Les particularités de la cinétique du transport, communes aux trois flavonoïdes, ont été mises en évidence par les phénomènes biphasiques observés. Les valeurs de la clearance en régime constant augmentent selon un facteur de 1,1 à 1,3 par rapport à celles de la phase initiale.

Les valeurs de la perméabilité initiale reflètent la phase distributive ou éventuellement le processus de fixation dans la membrane. La phase distributive *in vitro* ne correspond pas à celle *in vivo*. Dans le premier cas, le principe actif doit traverser l'épithélium ainsi que les lames musculaires sous-jacentes; il doit, en effet, traverser la paroi entière de façon

à être mesuré dans le compartiment séreux. *In vivo* et *in situ*, par contre, les cellules de l'épithélium constituent la seule barrière anatomique qui détermine l'absorption du principe actif. Dès l'instant où cette barrière a été traversée, le principe actif est aisément accessible aux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ainsi, la signification physiologique du temps de latence (tabl. 13) concernant le transport *in vitro* des principes actifs du compartiment muqueux vers le compartiment séreux est mise en doute, dans la mesure où l'irrigation sanguine n'est pas fonctionnelle et que le principe actif doit en plus traverser la musculuse et la séreuse, les deux représentant une barrière de stockage importante pour le transfert du principe actif¹⁶⁴. En outre, le fluide séreux a tendance à distendre latéralement le sac éversé. Les conséquences de cette distension sont une augmentation progressive du diamètre du lumen et une meilleure exposition des villosités et microvillosités envers la solution muqueuse. Cet effet a comme résultat d'augmenter la surface disponible pour le transfert et par conséquent les valeurs de la clearance pendant les premières 30 à 60 minutes d'expérience.

Finalement, on doit également suggérer la possibilité d'une détérioration progressive de la muqueuse, discutée dans un prochain paragraphe.

C. Influence d'adjuvants sur la vitesse de transfert

Taurocholate de sodium

Les sels biliaires, produits du catabolisme oxydatif du cholestérol par le foie, jouent un rôle important dans les processus d'absorption intestinale des lipides et d'autres constituants alimentaires.

Ces tensio-actifs physiologiques sont capables de former des micelles mixtes¹⁶⁵ dans la lumière intestinale et par conséquent facilitent l'absorption des matières grasses au niveau des cellules muqueuses du tractus digestif. Des solutions de micelles mixtes sont avant tout constituées de monoglycérides, d'acides gras et de sels biliaires. La bile est une solution de micelles mixtes contenant surtout des sels biliaires, du cholestérol et de la lécithine.

Les processus de transport des sels biliaires sont régis en partie par un mode actif, puisque des études ont révélé qu'ils sont transportés dans la bile contre des gradients de concentration, que le processus de transport peut être saturé et que certains acides entrent en compétition avec leur transport. Les sites de transport actif sont localisés dans l'iléon.

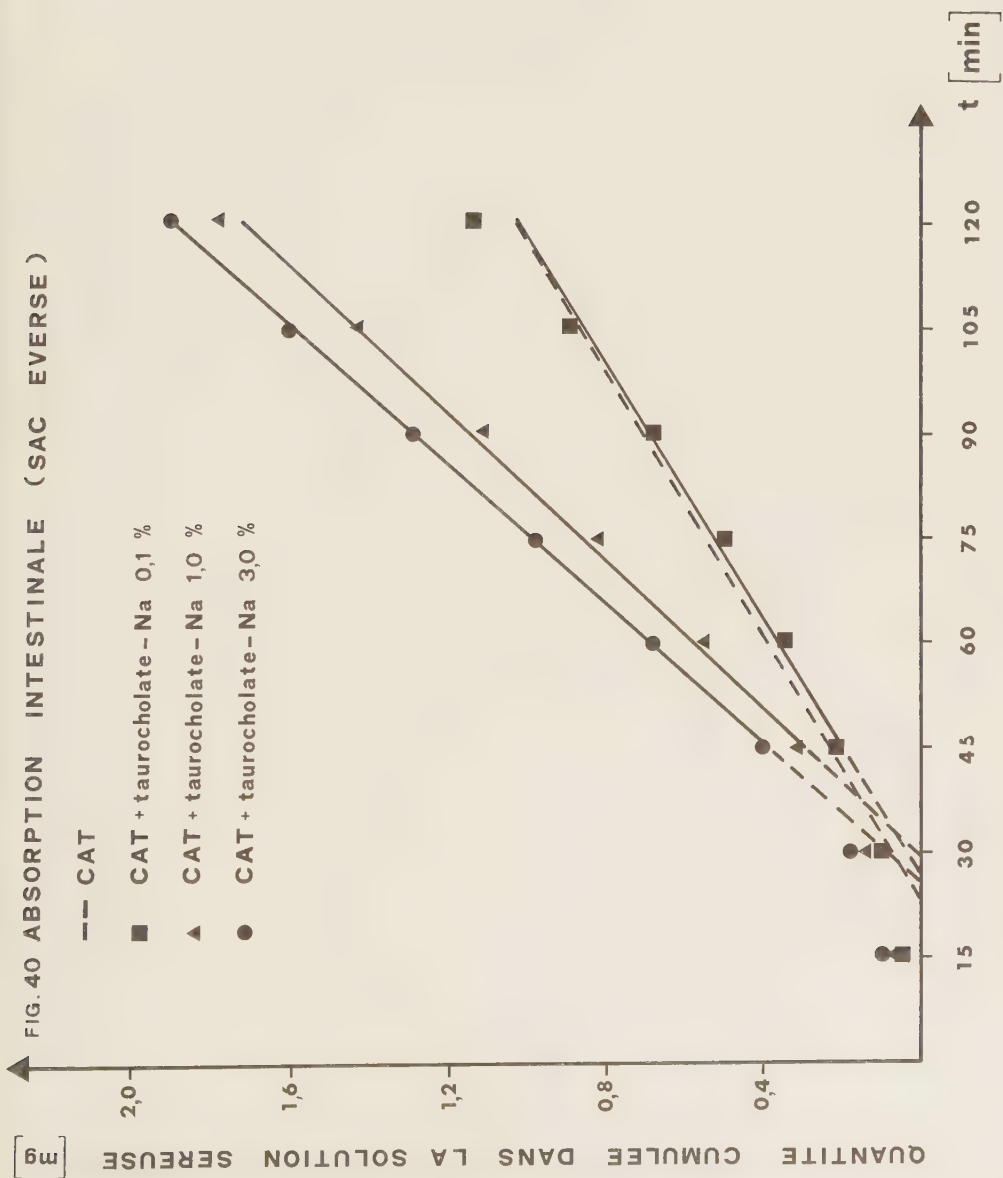
Les sels biliaires peuvent également être transportés par un mode passif (diffusion ionique et non-ionique, transport par convection). La diffusion passive non-ionique est un mécanisme de transport intestinal très peu probable pour le taurocholate-Na, en raison de la faible valeur de son pK_a^{66} , tandis qu'un transport actif dans nos conditions expérimentales est peu vraisemblable,

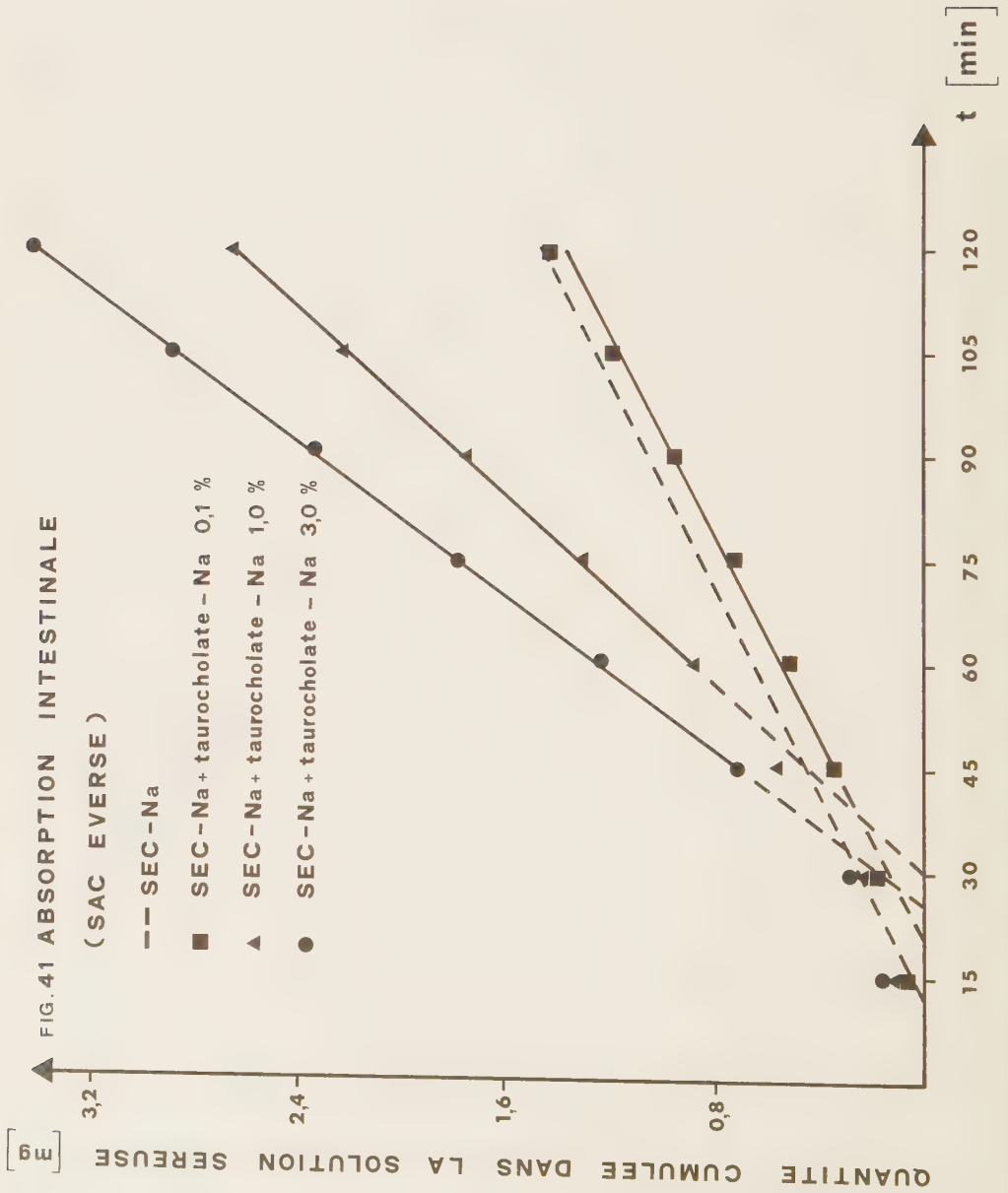
puisque les concentrations choisies en taurocholate-Na sont trop élevées¹¹⁴ et que les segments intestinaux sont excisés au niveau du jéjunum.

La diffusion ionique du taurocholate-Na est relativement faible et négligeable⁶⁶. L'ensemble de ces constatations nous permet de conclure à une absorption négligeable du taurocholate-Na dans nos conditions expérimentales.

Les sels biliaires peuvent affecter l'absorption de principes actifs au niveau de l'intestin grêle du rat selon trois mécanismes¹⁶⁶. Premièrement, les micelles formées ont une vitesse d'absorption différente de celle du principe actif "libre". Deuxièmement, les sels biliaires influencent la vitesse d'absorption d'un principe actif par rétention tissulaire à la surface absorbante de la membrane. Enfin, les sels biliaires peuvent avoir une action directe sur les caractéristiques de perméabilité de la muqueuse.

Le transport de la CAT, du SEC-Na et du Tri-HR en présence de taurocholate-Na, à trois concentrations différentes, est représenté graphiquement par les fig. 40 à 42 et les paramètres de perméabilité, exprimés en valeurs de clearance, sont groupés dans les tableaux 14 à 16.





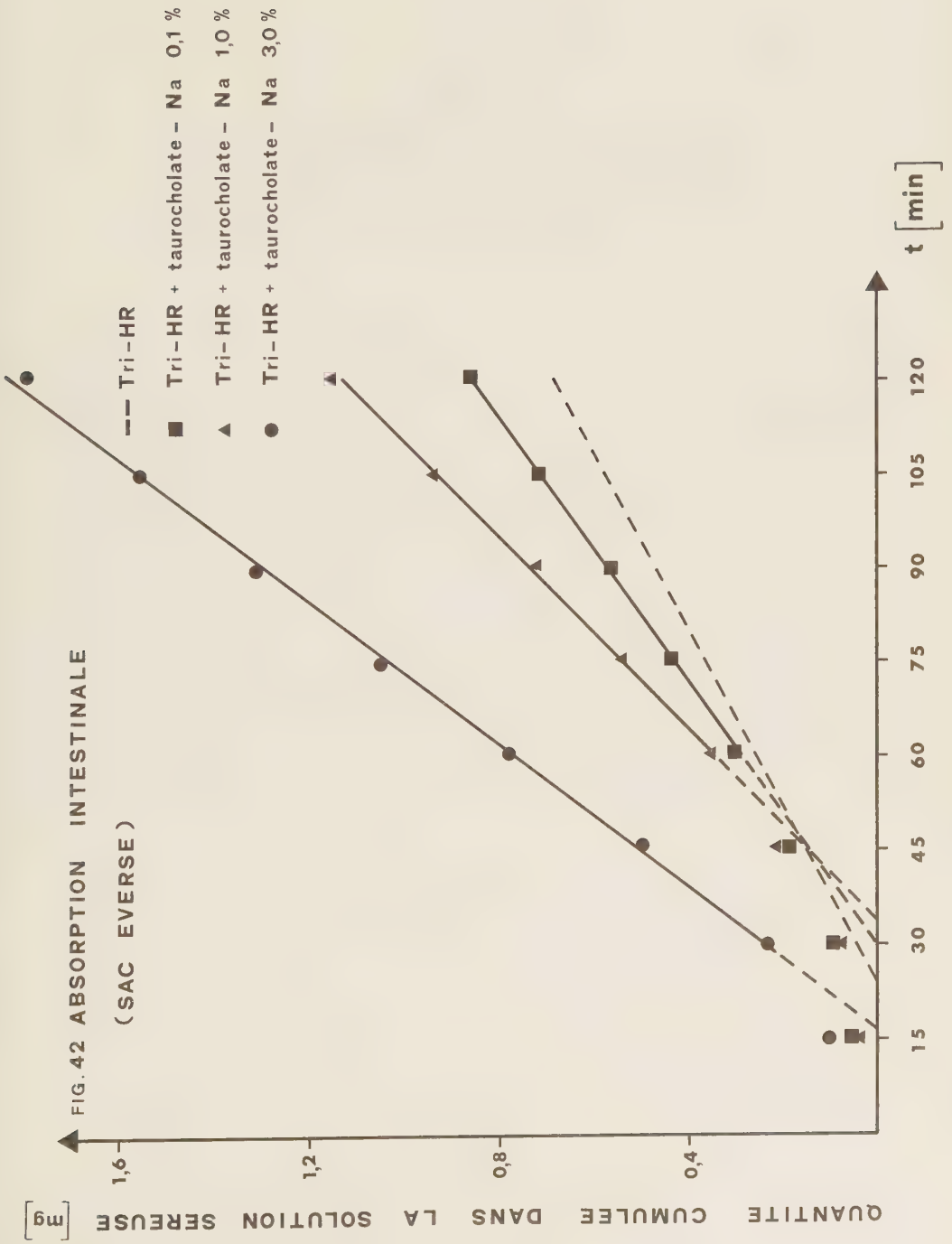


Tableau 14

*Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat de la
CAT en fonction du temps et de différentes concentrations en
taurocholate-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance*

Conc. [pds/vol] %	Minutes								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,085 ($\pm 0,007$)	0,166 ($\pm 0,010$)	0,273 ($\pm 0,014$)	0,399 ($\pm 0,018$)	0,561 ($\pm 0,015$)	0,728 ($\pm 0,015$)	0,904 ($\pm 0,018$)	1,052 ($\pm 0,021$)	23	3,33 ($\pm 0,14$)
0,10	0,056 ($\pm 0,009$)	0,114 ($\pm 0,001$)	0,217 ($\pm 0,015$)	0,352 ($\pm 0,019$)	0,518 ($\pm 0,018$)	0,711 ($\pm 0,026$)	0,922 ($\pm 0,023$)	1,142 ($\pm 0,023$)	26	2,93 ($\pm 0,17$)
1,00	0,050 ($\pm 0,001$)	0,162 ($\pm 0,006$)	0,333 ($\pm 0,008$)	0,554 ($\pm 0,023$)	0,819 ($\pm 0,032$)	1,107 ($\pm 0,055$)	1,447 ($\pm 0,077$)	1,795 ($\pm 0,078$)	30	4,62 ($\pm 0,17$)
3,00	0,059 ($\pm 0,004$)	0,205 ($\pm 0,078$)	0,405 ($\pm 0,093$)	0,700 ($\pm 0,095$)	1,013 ($\pm 0,136$)	1,329 ($\pm 0,172$)	1,635 ($\pm 0,205$)	1,927 ($\pm 0,238$)	25	5,83 ($\pm 1,97$)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne
d'au moins trois expériences.

Tableau 15

*Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat
du SEC-Na en fonction du temps et de différentes concentrations
en taurocholate-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance*

Conc. [pds/vol.] %	Minutes								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,148 (+0,004)	0,283 (+0,002)	0,447 (+0,013)	0,631 (+0,021)	0,832 (+0,033)	1,034 (+0,048)	1,255 (+0,067)	1,472 (+0,064)	12	5,25 (+0,17)
0,10	0,088 (+0,010)	0,203 (+0,006)	0,337 (+0,019)	0,518 (+0,020)	0,726 (+0,029)	0,952 (+0,036)	1,196 (+0,055)	1,447 (+0,063)	20	4,31 (+0,17)
1,00	0,110 (+0,015)	0,299 (+0,066)	0,578 (+0,076)	0,914 (+0,087)	1,304 (+0,060)	1,748 (+0,062)	2,237 (+0,067)	2,738 (+0,077)	30	7,62 (+0,73)
3,00	0,149 (+0,025)	0,363 (+0,074)	0,738 (+0,124)	1,237 (+0,135)	1,819 (+0,135)	2,325 (+0,102)	2,913 (+0,070)	3,444 (+0,086)	25	10,31 (+1,13)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne
d'au moins trois expériences.

Tableau 16

*Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat
du Tri-HR en fonction du temps et de différentes concentrations
en taurocholate-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance*

Conc. [pds/vol.] %	Minutes								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,045 (+0,003)	0,102 (+0,002)	0,177 (+0,008)	0,261 (+0,007)	0,370 (+0,011)	0,477 (+0,025)	0,587 (+0,022)	0,692 (+0,025)	22	2,18 (+0,00)
0,10	0,045 (+0,001)	0,106 (+0,007)	0,194 (+0,011)	0,312 (+0,016)	0,440 (+0,012)	0,568 (+0,006)	0,720 (+0,013)	0,864 (+0,009)	30	2,60 (+0,10)
1,00	0,038 (+0,002)	0,099 (+0,009)	0,215 (+0,010)	0,360 (+0,035)	0,528 (+0,035)	0,717 (+0,037)	0,949 (+0,021)	1,182 (+0,021)	34	3,00 (+0,28)
3,00	0,084 (+0,017)	0,232 (+0,017)	0,482 (+0,049)	0,793 (+0,068)	1,078 (+0,076)	1,347 (+0,093)	1,584 (+0,110)	1,815 (+0,118)	17	6,61 (+0,57)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne

d'au moins trois expériences.

Les résultats montrent que l'effet du taurocholate-Na est dû à deux mécanismes différents; l'un intervient à des concentrations de taurocholate-Na inférieures à la CMC, révélant un faible abaissement peu significatif de la vitesse de transfert pour la CAT et le SEC-Na et une augmentation peu marquée pour le Tri-HR; l'autre mécanisme prend effet à des concentrations de taurocholate supérieures à la CMC, se manifestant par une forte augmentation de la perméabilité de la membrane intestinale.

Une concentration de 3% en taurocholate augmente, par exemple, les valeurs de la clearance de la CAT, du SEC-Na et du Tri-HR d'un facteur correspondant respectivement à 1,8, 2,0 et 3,0 par rapport à celles des expériences sans sel biliaire. Ce résultat montre que la substance la moins absorbée par l'intestin éversé du rat, le Tri-HR, est davantage influencée positivement par des concentrations micellaires en taurocholate. En effet, en utilisant une technique *in situ*, Kakemi et coll.^{166,167} ont pu mettre en évidence le rôle prédominant de l'action accélératrice du taurocholate sur l'absorption d'un principe actif peu absorbé.

De plus, les concentrations en taurocholate ont une influence sur les temps de latence des principes actifs (tabl. 14-16). Une concentration de 3% en taurocholate réduit, par exemple, le temps de latence de 5 minutes pour les dérivés flavanoliques et de 17 minutes pour le Tri-HR, par rapport à celle de 1%. Ce résultat laisse déjà prévoir l'importance jouée par la membrane elle-même.

Si on se reporte aux expériences effectuées à l'aide de la membrane de cellophane, on peut constater que les vitesses de transport des dérivés flavanoliques augmentent en présence de taurocholate à des concentrations supérieures à la CMC. Dans ce cas, les passages de la CAT et du SEC-Na ont été accélérés avec des concentrations de 1% en taurocholate-Na, selon un facteur respectivement de 1,8 et 3,1 par rapport à l'expérience sans tensio-actif. Les facteurs correspondant aux expériences effectuées sur la membrane biologique s'élèvent à 1,4 pour les deux composés. Dans le cas de la membrane synthétique, une solubilisation micellaire n'est pas observée. Par analogie, la disponibilité des principes actifs contenus dans la solution muqueuse de l'expérience effectuée avec le sac éversé, n'est pas réduite. Ces observations montrent que les effets du taurocholate se produisent au niveau de la perméabilité de la membrane.

Des études de *Feldman et coll.*^{147-149, 168, 169} ont montré que la présence de tensio-actifs physiologiques favorise le passage à travers l'intestin éversé du rat. Le mécanisme exact de l'action des sels biliaires, concernant l'altération de la perméabilité de la membrane biologique, n'a pas encore été élucidé, malgré plusieurs postulats :

- a) La fraction de principe actif fixée à la muqueuse est augmentée par les sels biliaires¹⁶⁶ ; il y a, en effet, une élévation de la concentration du principe actif à la surface de la muqueuse par adsorption.

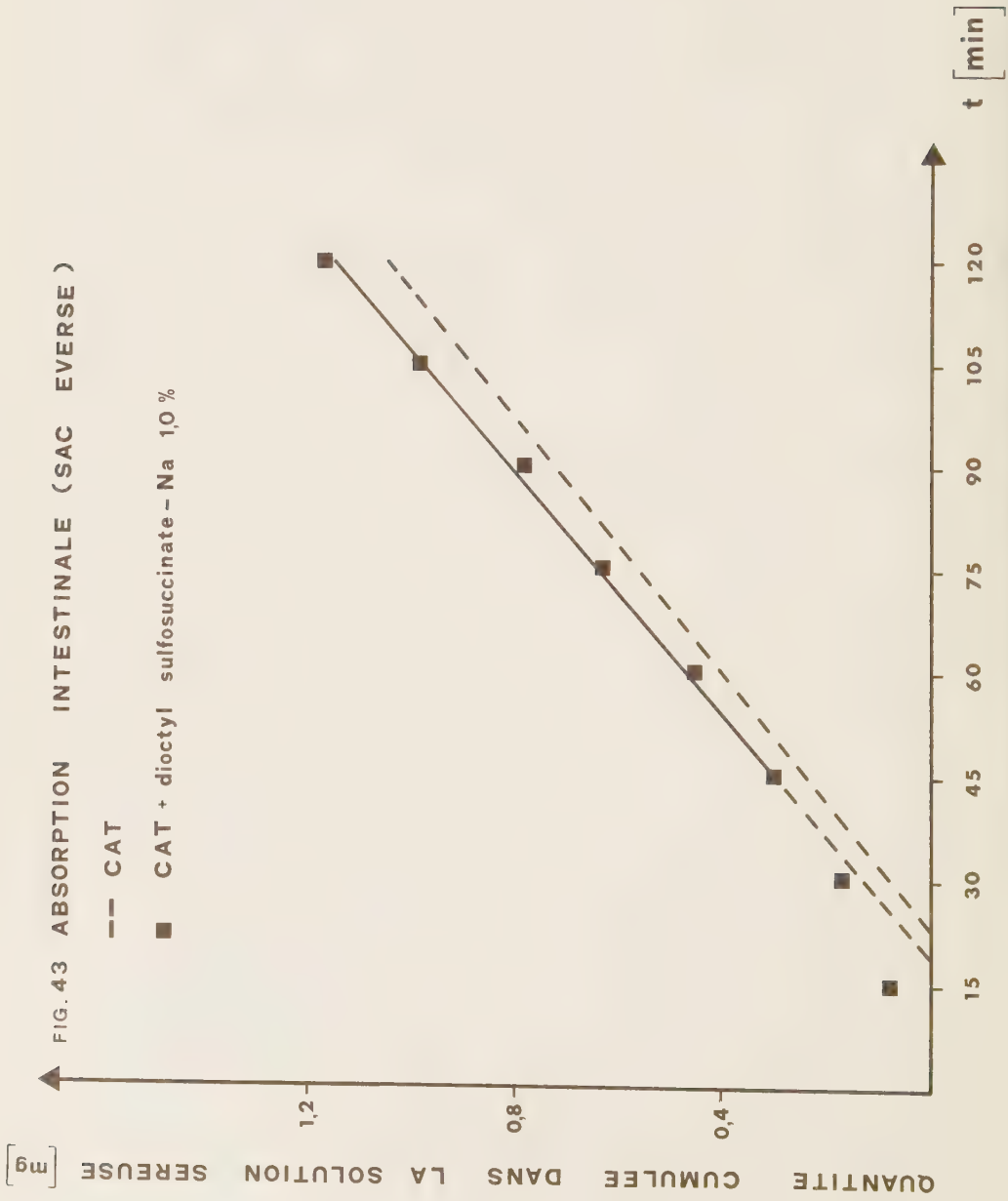
- b) Le sel biliaire modifie la perméabilité de la membrane par épuisement du calcium et du magnésium, faiblement liés à la structure de la membrane. Ces deux ions fonctionnent comme régulateurs de la perméabilité aqueuse de l'épithélium intestinal. L'EDTA, ainsi que le taurodéoxycholate, modifient la perméabilité membranaire par des mécanismes différents¹⁴⁸.
- c) Le mécanisme est dû à une interaction du sel biliaire, en concentration supérieure à la CMC, avec des phospholipides de la membrane¹⁶⁸. Le sel biliaire accélère la libération de constituants de la membrane, ce qui entraîne une altération de cette dernière¹⁶⁹.

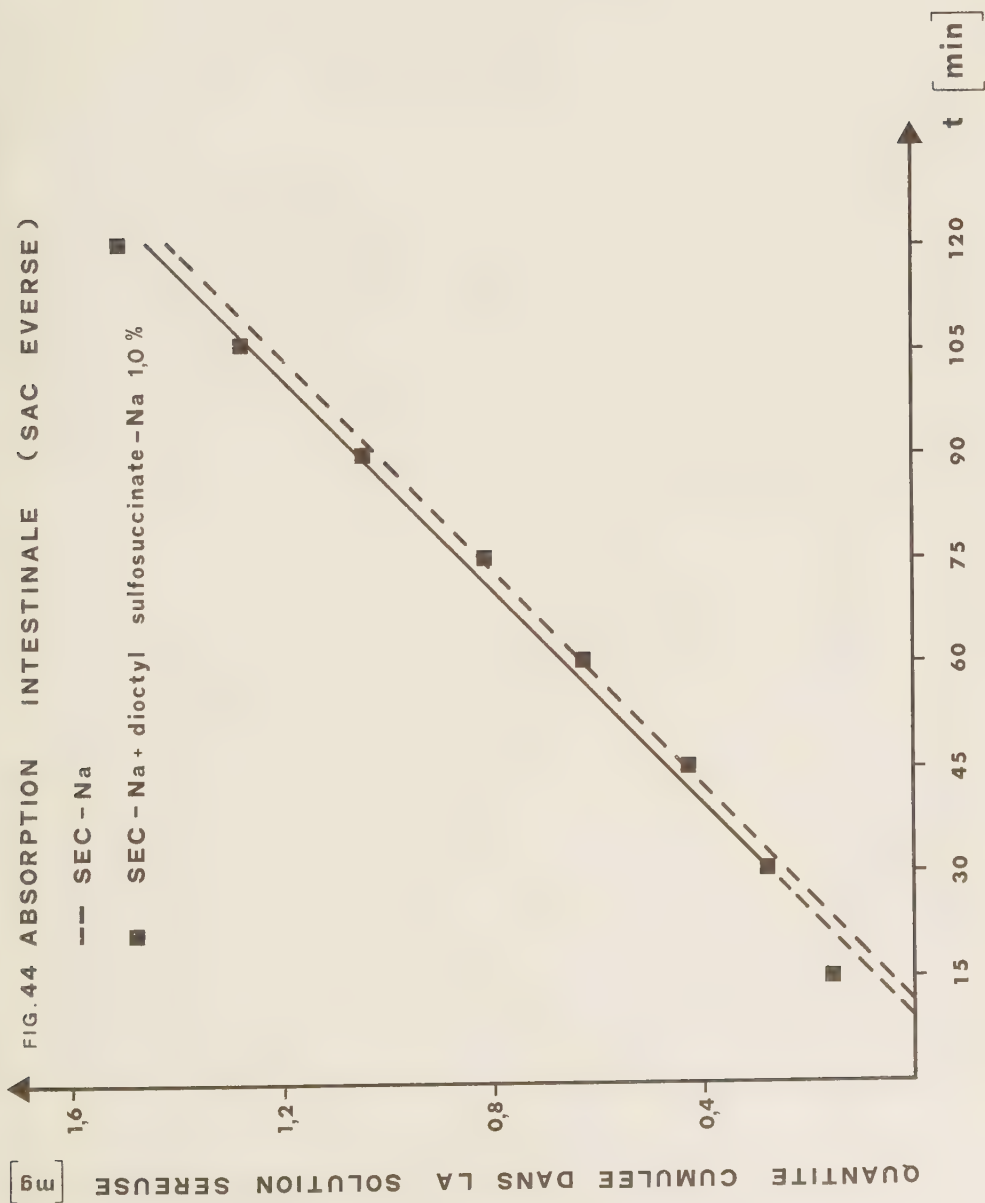
Diocetyl sulfosuccinate de sodium (DSS-Na) et carboxyméthyl-cellulose de sodium (CMC-Na)

Le DSS-Na est utilisé en thérapeutique contre la constipation, grâce à l'hydratation fécale qu'il provoque au niveau du côlon. Pharmacologiquement, le DSS-Na est relativement non toxique et n'est pratiquement pas absorbé par le tractus gastro-intestinal⁶⁵.

*Lish et coll.*¹⁷⁰ ont montré que le rouge de phénol, colorant théoriquement non absorbé, l'est par contre par le côlon en présence de DSS-Na. Ces auteurs suggèrent, dans ce cas, la participation de processus biologiques actifs.

Les courbes cumulatives des flavonoïdes apparaissant du côté séreux de la membrane (fig. 43-45) en présence de DSS-Na dans la solution muqueuse, révèlent que ce tensio-actif anionique n'a quasiment aucun effet sur les caractéristiques de transport des principes actifs; les valeurs de clearance (tabl. 17-19) sont en effet fortement voisines de celles obtenues sans DSS-Na.





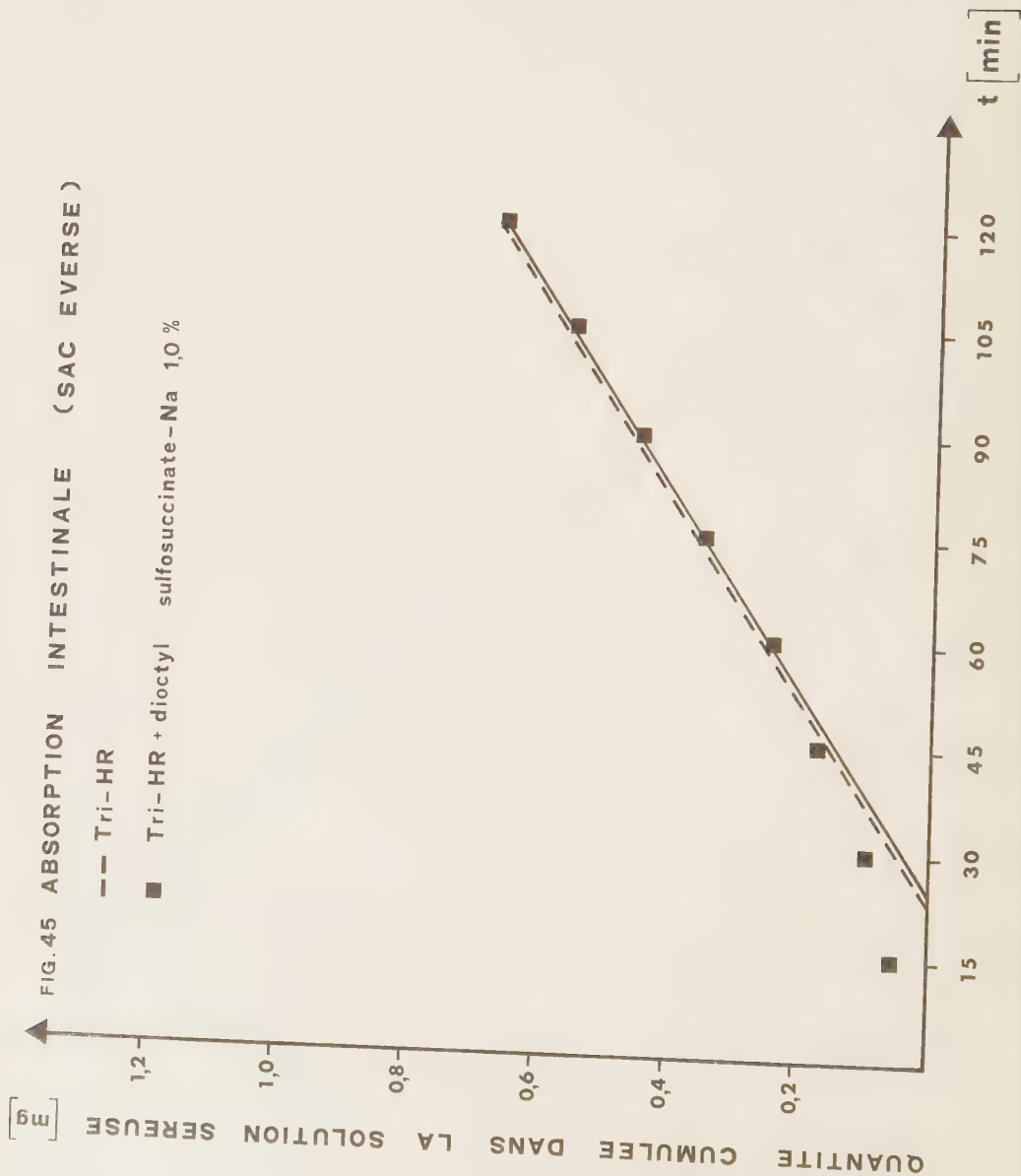


Tableau 17

Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat de la CAT en fonction du temps et de la concentration en dioctyl sulfosuccinate-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance

Conc. [pds/vol.] %	Minutes								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,085 (+0,007)	0,166 (+0,010)	0,273 (+0,014)	0,399 (+0,018)	0,561 (+0,015)	0,728 (+0,015)	0,904 (+0,018)	1,052 (+0,021)	23	3,33 (+0,14)
1,00	0,082 (+0,005)	0,183 (+0,004)	0,309 (+0,008)	0,457 (+0,010)	0,636 (+0,012)	0,794 (+0,010)	0,992 (+0,011)	1,190 (+0,008)	19	3,81 (+0,10)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne d'au moins trois expériences.

Tableau 18

Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat du SEC-Na en fonction du temps et de la concentration en dioctyl sulfosuccinate-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance

Conc. [pds/vol.] %	Minutes								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,148 (+0,004)	0,283 (+0,002)	0,447 (+0,013)	0,631 (+0,021)	0,832 (+0,033)	1,034 (+0,048)	1,255 (+0,067)	1,472 (+0,064)	12	5,25 (+0,17)
1,00	0,131 (+0,001)	0,273 (+0,007)	0,452 (+0,001)	0,643 (+0,012)	0,856 (+0,005)	1,066 (+0,018)	1,293 (+0,028)	1,526 (+0,044)	10	5,36 (+0,00)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne d'au moins trois expériences.

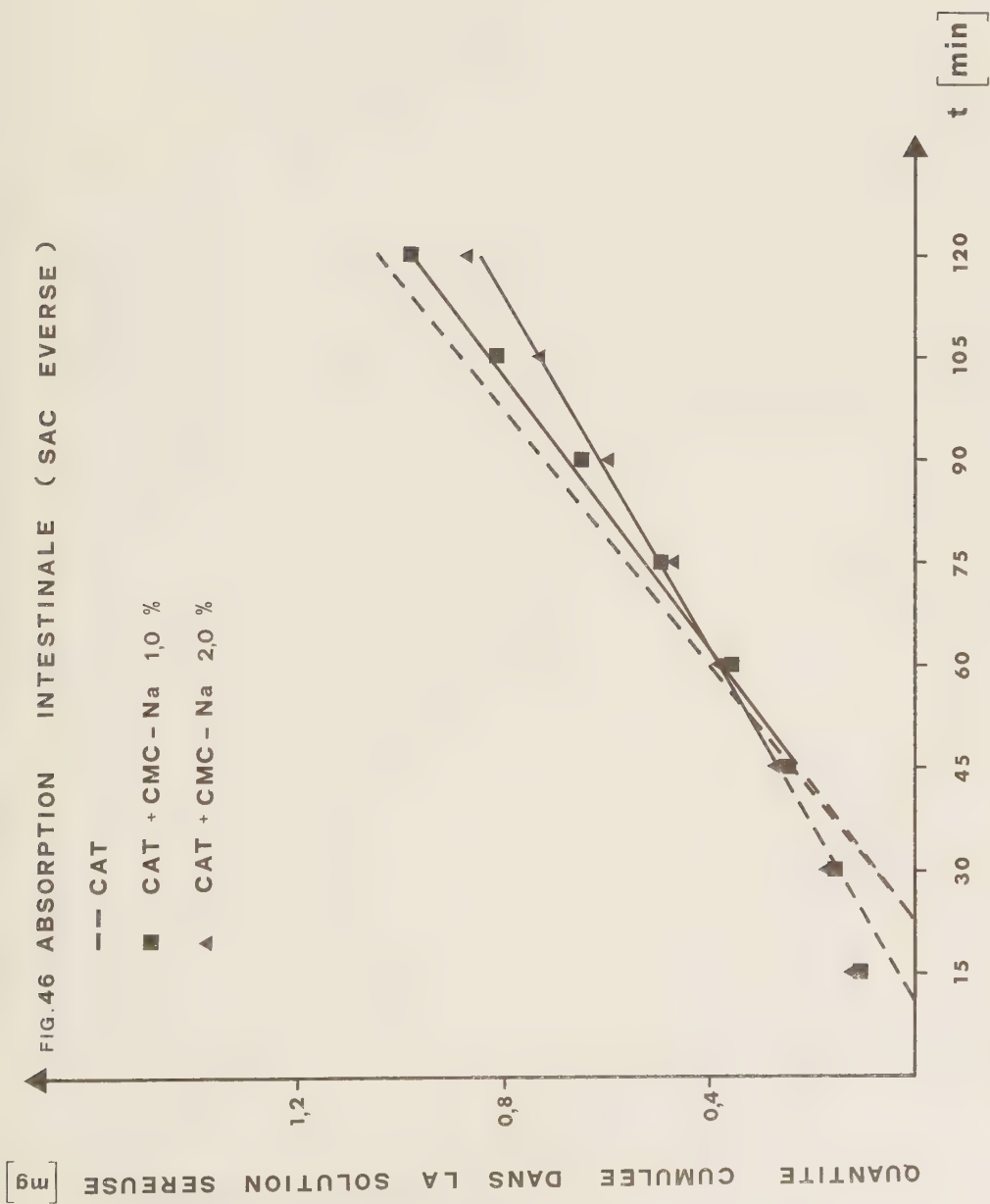
Tableau 19

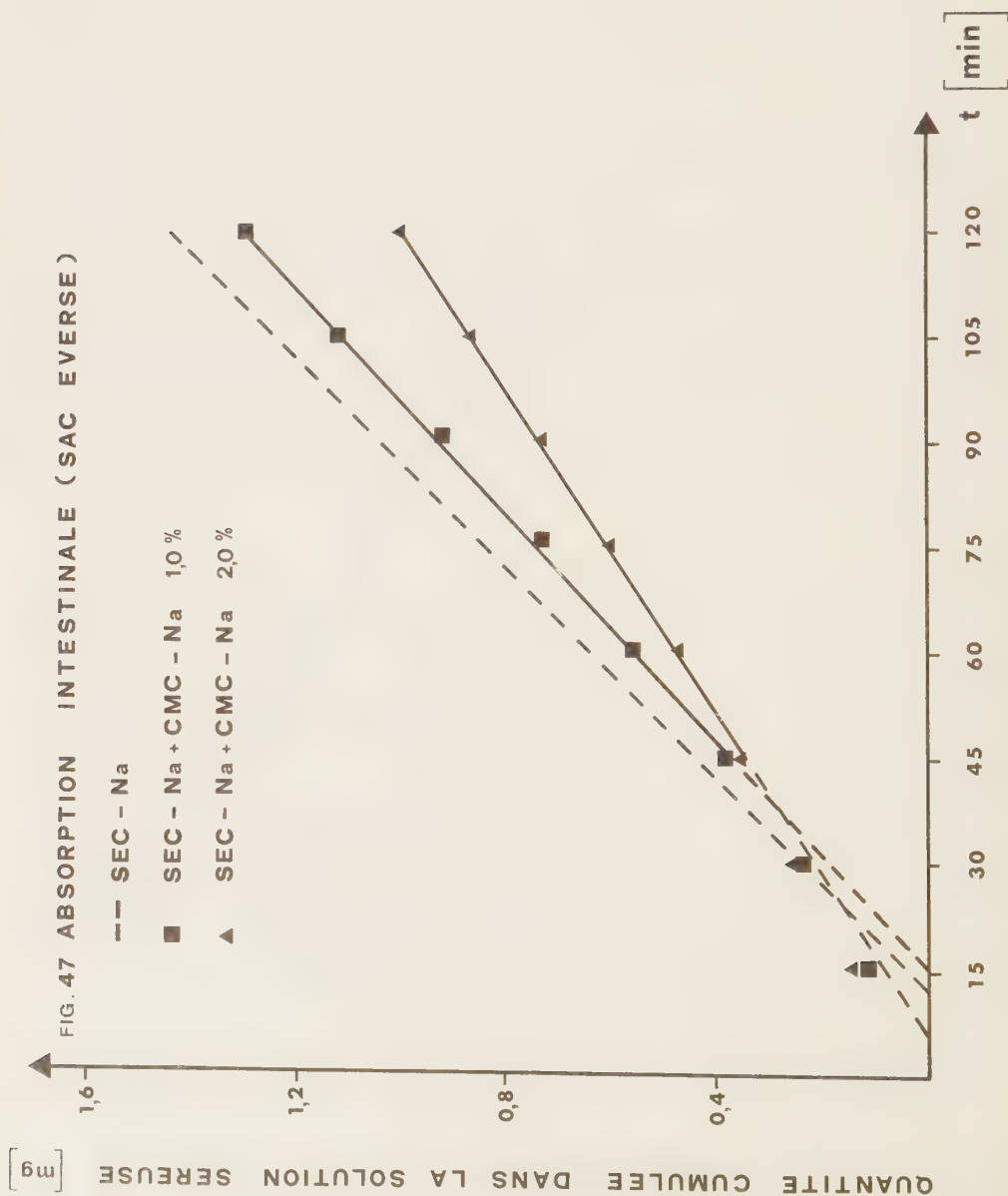
*Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat
du Tri-HR en fonction du temps et de la concentration en dioctyl
sulfosuccinate-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance*

Conc. [pds/vol] %	Minutes								L [min]	Clearance x 10 ³ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,045 (+0,003)	0,102 (+0,002)	0,177 (+0,008)	0,261 (+0,007)	0,370 (+0,011)	0,477 (+0,025)	0,587 (+0,022)	0,692 (+0,025)	22	2,18 (+0,00)
1,00	0,048 (+0,003)	0,105 (+0,006)	0,173 (+0,015)	0,268 (+0,015)	0,363 (+0,012)	0,465 (+0,020)	0,574 (+0,017)	0,693 (+0,021)	25	2,23 (+0,10)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne
d'au moins trois expériences.

Ce résultat permet de conclure que le DSS-Na et le taurocholate, possédant les deux une similitude structurale de la partie hydrophile (groupement sulfonate), n'ont pas le même mode d'action. Le DSS-Na ne modifie pas la perméabilité de la membrane biologique par une altération structurale. La CMC-Na, à deux concentrations différentes, ralentit la vitesse de transfert des trois flavonoïdes, (tabl. 20-22, fig. 46-48). Ce résultat pourrait être attribué à une diffusibilité réduite des principes actifs en raison de la viscosité croissante de la solution muqueuse.





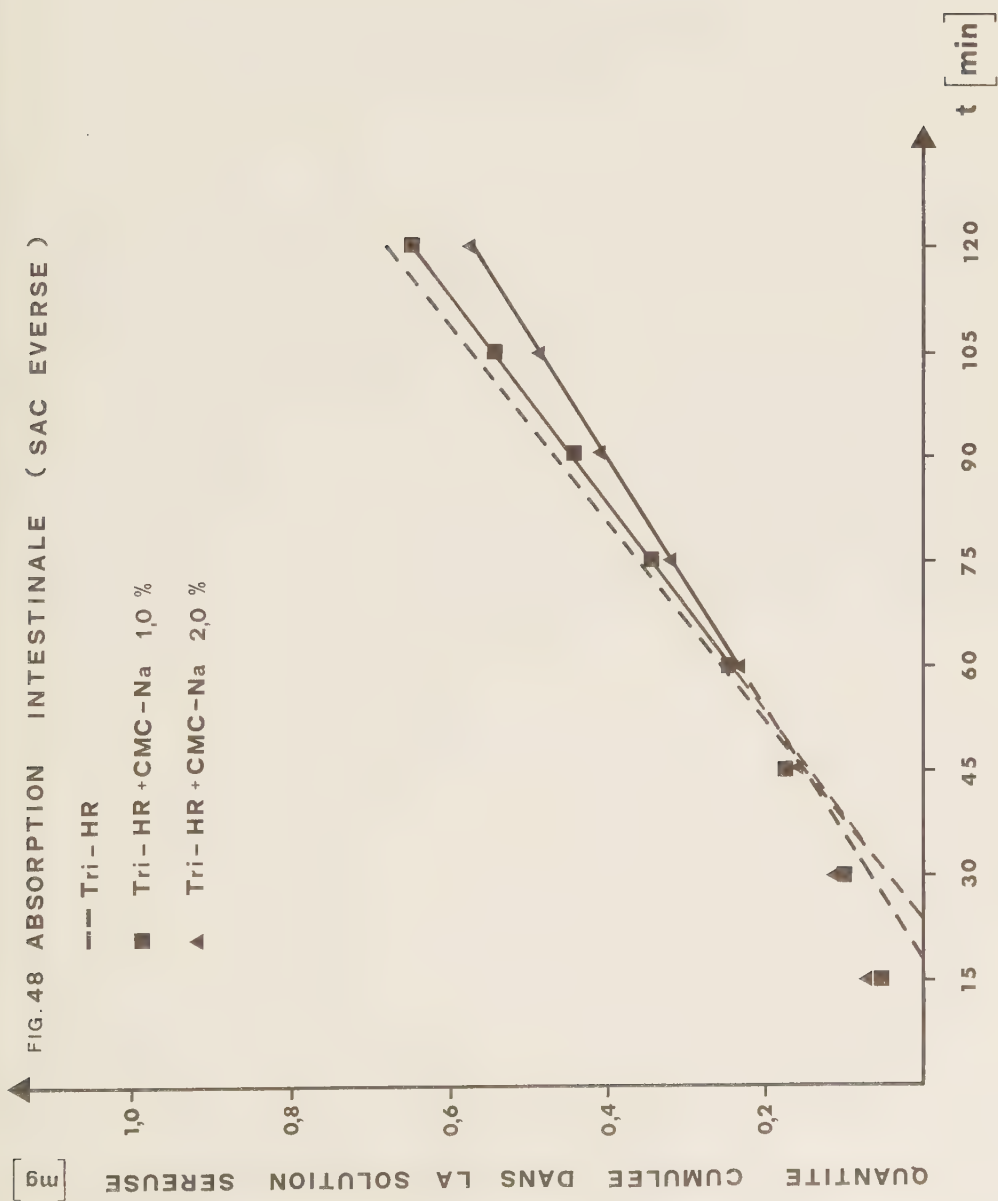


Tableau 20

*Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat de la
CAT en fonction du temps et de différentes concentrations en CMC-Na,
temps de latence (L) et valeurs de clearance*

Conc. [pds/vol.] %	Minutes								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,085 (+0,007)	0,166 (+0,010)	0,273 (+0,014)	0,399 (+0,018)	0,561 (+0,015)	0,728 (+0,015)	0,904 (+0,018)	1,052 (+0,021)	23	3,33 (+0,14)
1,00	0,083 (+0,008)	0,166 (+0,014)	0,257 (+0,014)	0,372 (+0,011)	0,507 (+0,015)	0,659 (+0,013)	0,827 (+0,013)	1,000 (+0,003)	23	3,10 (+0,00)
2,00	0,099 (+0,001)	0,184 (+0,002)	0,272 (+0,002)	0,372 (+0,010)	0,484 (+0,013)	0,606 (+0,024)	0,755 (+0,020)	0,905 (+0,020)	11	3,10 (+0,00)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne
d'au moins trois expériences.

Tableau 21

*Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat du
SEC-Na en fonction du temps et de différentes concentrations en
CMC-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance*

Conc. [pds/vol.] %	M i n u t e s								L [min]	Clearance x 10 ³ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,148 (+0,004)	0,283 (+0,002)	0,447 (+0,013)	0,631 (+0,021)	0,832 (+0,033)	1,034 (+0,048)	1,255 (+0,067)	1,472 (+0,064)	12	5,25 (+0,17)
1,00	0,119 (+0,004)	0,244 (+0,022)	0,389 (+0,026)	0,552 (+0,029)	0,715 (+0,029)	0,909 (+0,024)	1,104 (+0,010)	1,309 (+0,010)	16	4,60 (+0,22)
2,00	0,144 (+0,002)	0,258 (+0,007)	0,371 (+0,011)	0,478 (+0,015)	0,597 (+0,021)	0,728 (+0,027)	0,865 (+0,031)	1,008 (+0,035)	6	3,99 (+0,14)

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne
d'au moins trois expériences.

Tableau 22

*Transfert cumulatif en mg à travers l'intestin éversé du rat du
Tri-HR en fonction du temps et de différentes concentrations en
CMC-Na, temps de latence (L) et valeurs de clearance*

Conc. [pds/vol.] %	M i n u t e s								L [min]	Clearance $\times 10^3$ [ml/min]
	15	30	45	60	75	90	105	120		
0	0,045 (+0,003) -0,003	0,102 (+0,002) -0,002	0,177 (+0,008) -0,008	0,261 (+0,007) -0,007	0,370 (+0,011) -0,011	0,477 (+0,025) -0,025	0,587 (+0,022) -0,022	0,692 (+0,025) -0,025	22	2,18 (+0,00) -0,00
1,00	0,044 (+0,003) -0,003	0,096 (+0,001) -0,001	0,170 (+0,001) -0,001	0,249 (+0,005) -0,005	0,342 (+0,009) -0,009	0,441 (+0,013) -0,013	0,547 (+0,020) -0,020	0,657 (+0,020) -0,020	21	2,08 (+0,00) -0,00
2,00	0,058 (+0,004) -0,004	0,111 (+0,001) -0,001	0,171 (+0,002) -0,002	0,239 (+0,005) -0,005	0,316 (+0,008) -0,008	0,400 (+0,007) -0,007	0,484 (+0,009) -0,009	0,588 (+0,015) -0,015	19	1,99 (+0,00) -0,00

Les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne
d'au moins trois expériences.

*D. Influence de la nature des cations de la solution
physiologique sur la vitesse de transfert*

L'influence du K^+ sur le transfert intestinal a été évaluée quantitativement en pourcent d'inhibition¹⁷¹ du transfert pendant une période d'une heure :

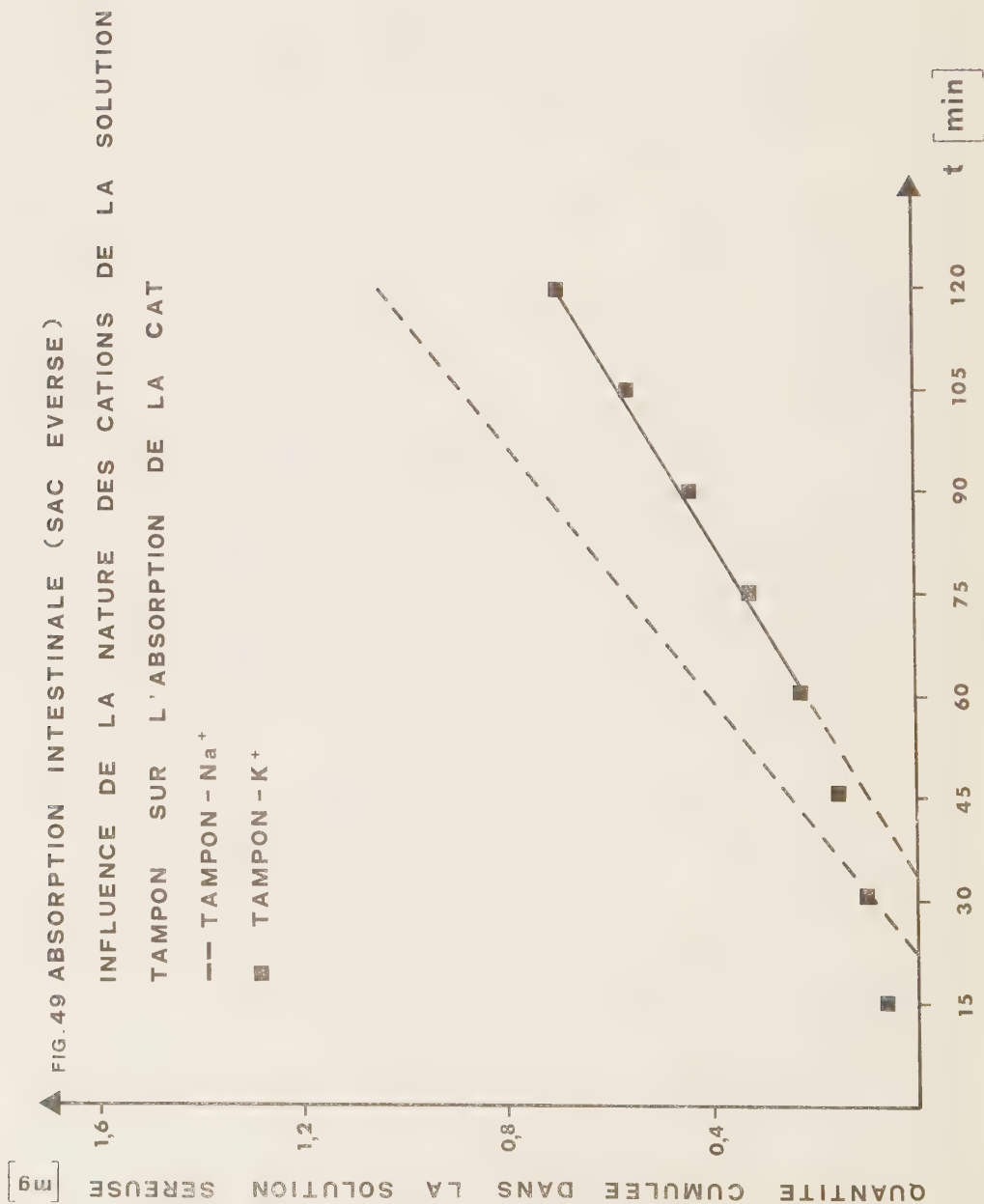
$$\% \text{ inhibition} = 100 \left[1 - \frac{q_{K^+}}{q_{Na^+}} \right] \quad (33)$$

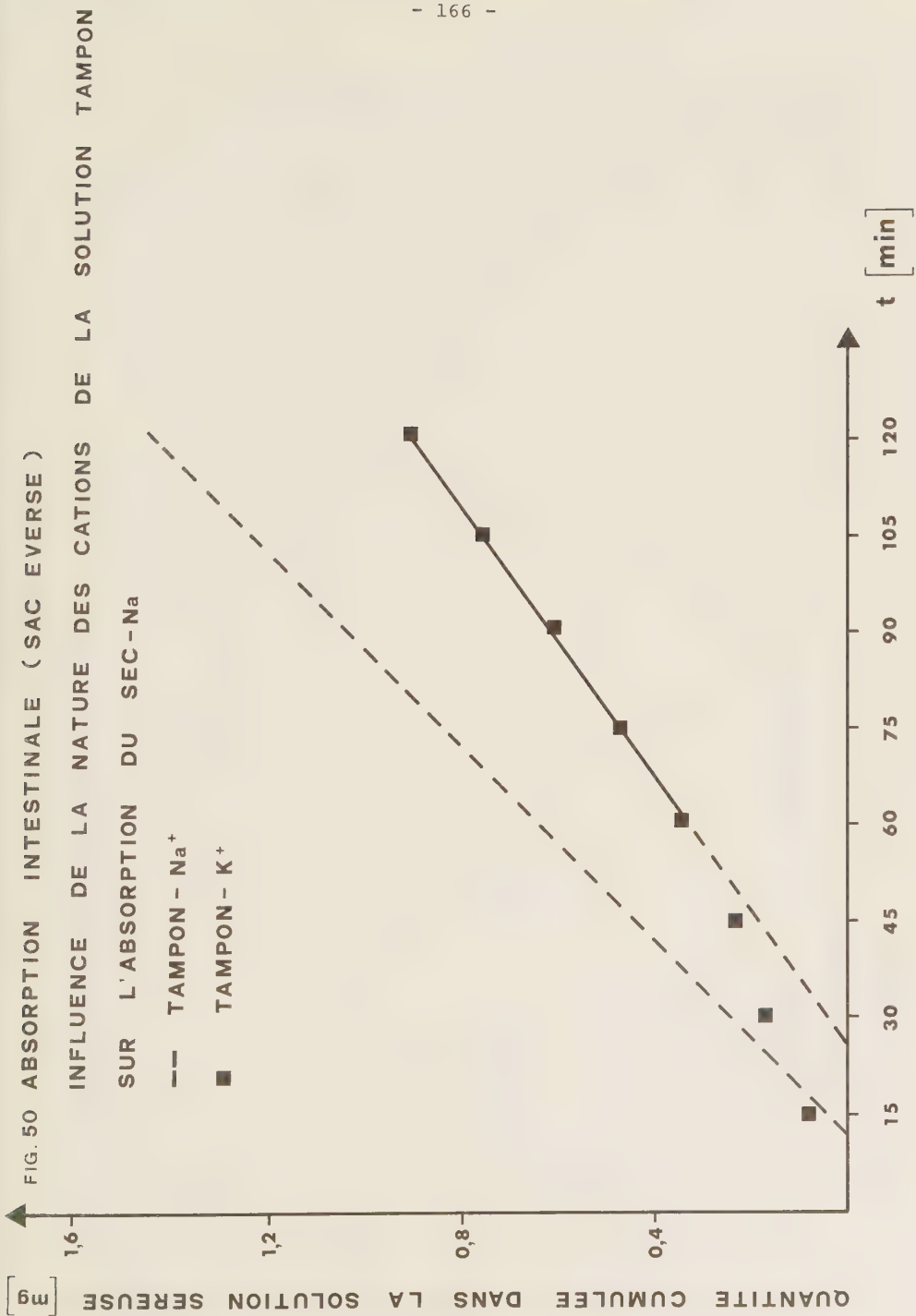
où q_{K^+} et q_{Na^+} sont les quantités cumulatives de substance transférée pendant 1 h, respectivement dans le tampon- K^+ et le tampon- Na^+ .

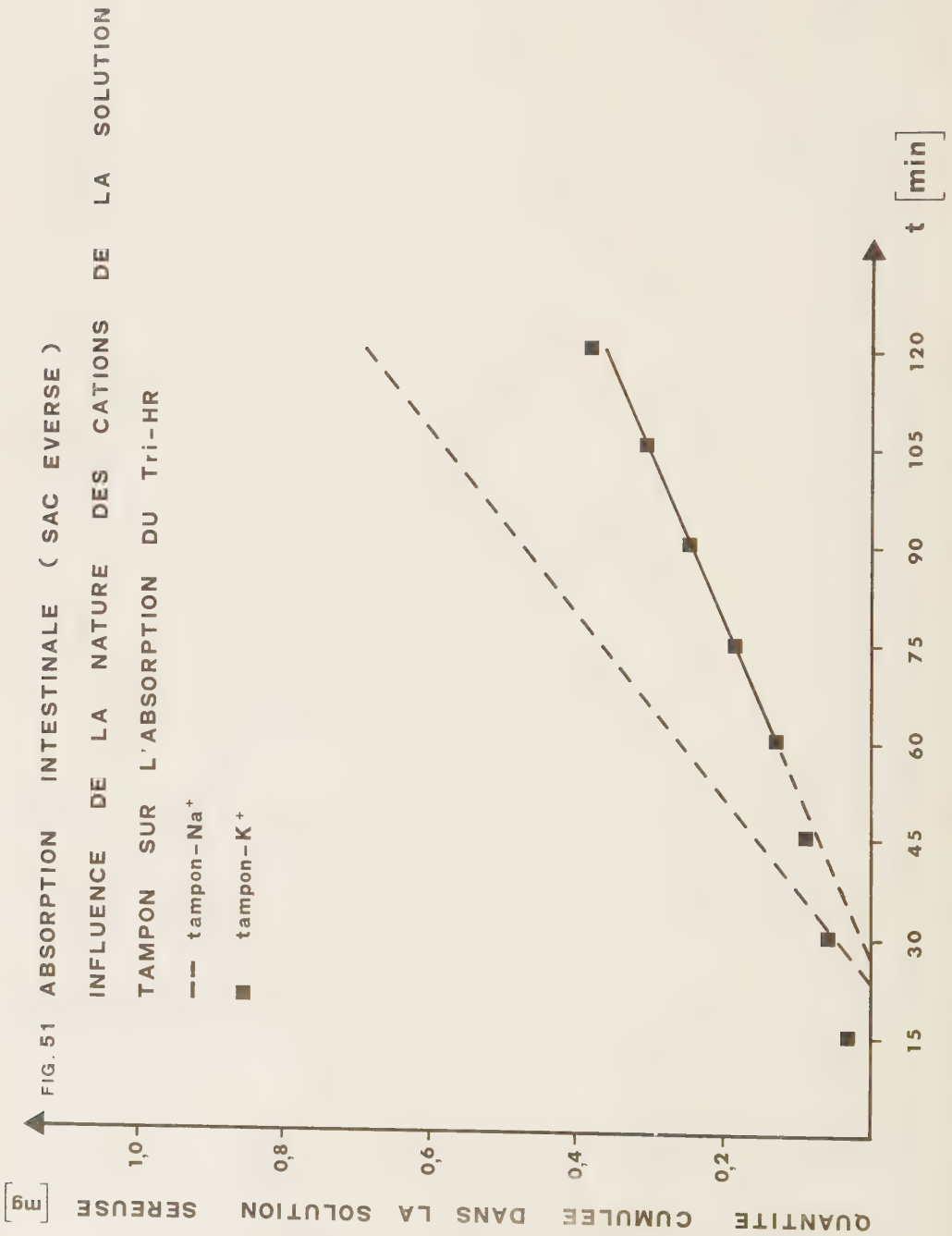
Les figures 49-51 représentent les courbes cumulatives de la concentration séreuse de la CAT, du SEC-Na et du Tri-HR dans le tampon- K^+ et dans la solution témoin (tampon- Na^+).

Il est évident, comme le montrent les graphiques, que la modification de la composition cationique de la solution par substitution du Na^+ par K^+ , diminue significativement le taux de transfert pour les trois dérivés; le tampon- K^+ inhibe le transfert.

On a constaté que le degré de gonflement du sac intestinal est plus important dans une solution tampon- K^+ que dans un tampon- Na^+ . Ce même phénomène a été observé lorsque le tissu n'a pas été oxygéné; ces conditions d'anaérobiose partielle ont réduit la vitesse de transport des trois flavonoïdes. Puisque les périodes de latence sont directement dépendantes de l'épaisseur de la membrane intestinale, elles sont d'autant plus courtes que







l'épaisseur de la barrière intestinale est plus faible. Ce résultat est confirmé par les périodes de latence plus courtes obtenues avec le tampon- Na^+ (23, 12 et 22 minutes respectivement pour CAT, SEC- Na et Tri-HR) comparativement au tampon- K^+ (respectivement 34, 26 et 28 minutes).

Tableau 23

Inhibition du transfert par K^+

Principes actifs	Poids moléculaires	Clearances [ml/h] ^(a)	% d'inhibition de transfert dans tampon- K^+ ^(c)
CAT	362,3	0,199(4,6) ^(b)	44,81
SEC- Na	464,4	0,315(3,3) ^(b)	45,33
Tri-HR	742,7	0,130(2,8) ^(b)	49,43

(a) valeurs calculées d'après la quantité cumulative transférée après une période de 1 h dans le tampon- Na^+

(b) coefficient de variation, c'est-à-dire l'écart-type exprimé sous forme de pourcentage par rapport à la moyenne de trois expériences

(c) valeurs calculées d'après la quantité cumulative transférée après une période de 1 h

Les résultats de ces expériences sont groupés dans le tableau 23. Dans une certaine mesure, l'effet d'inhibition varie d'un principe actif à l'autre. En fait, le transport du Tri-HR, qui a la clearance la plus faible, est plus inhibé que celui des dérivés flavanoliques. La CAT, liposoluble, est la moins affectée

par cette inhibition. *Mayersohn* et coll.¹⁷¹ ont montré que le pourcentage d'inhibition du transfert est inversement proportionnel à la valeur de la clearance de substances possédant des caractéristiques de perméabilité différentes.

Le tableau 23 indique également que la molécule la plus grande est la plus inhibée. Ce résultat est aussi en parfait accord avec l'étude de *Mayersohn*, pour qui le paramètre le plus important influençant le pourcentage d'inhibition de transfert, est la grandeur des molécules du principe actif.

Le transport passif peut être non seulement inhibé par la composition cationique (K^+ , NH_4^+ , Li^+) du tampon¹⁷¹⁻¹⁷⁴, mais aussi par l'adjonction de glucose ou xylose à la solution tampon¹⁷⁵; d'autre part, une solution hypotonique réduit également le transfert¹⁷⁶.

Ces conditions d'inhibition du transfert, selon ces auteurs, sont provoquées par une rétention tissulaire du fluide, qui se manifeste par un gonflement des cellules épithéliales. L'inhibition est d'autant plus marquée que la rétention tissulaire de l'eau est plus importante.

On peut supposer plusieurs mécanismes pour interpréter l'effet du tampon- K^+ sur la vitesse de transport¹⁷⁵. Le premier tient compte de la concentration effective dans le tissu intestinal. Ainsi, en présence du tampon- K^+ , le volume des cellules muqueuses augmente par pénétration d'eau, provoquant une diminution de la concentration cellulaire du principe actif et un abaissement du gradient de concentration entre les barrières

apicale et basale. Si le transfert tissulaire en direction du compartiment séreux est susceptible d'en déterminer la vitesse, on obtient, par conséquent, une diminution de la vitesse d'apparition du principe actif.

Une autre possibilité est le passage des substances par la voie aqueuse. Le gonflement cellulaire, en présence du tampon- K^+ , provoque une extension des cellules adjacentes; il en résulte une réduction des espaces intercellulaires (canaux aqueux situés entre les cellules adjacentes) et de cette manière, le diamètre effectif des pores ou canalicules diminue.

Deux voies de passage sont accessibles pour la diffusion d'un principe actif à travers l'intestin grêle; d'une part, le principe actif peut passer par une voie lipidique ou cellulaire, d'autre part, par une voie aqueuse ou extracellulaire. S'il en est ainsi, le taux d'inhibition du transfert, provoqué par le gonflement cellulaire, est dépendant de la voie d'absorption que prend le principe actif. Par exemple, la CAT, dérivé liposoluble, diffuse en partie par la voie cellulaire, et, par conséquent, est moins affectée par le gonflement des cellules (tabl. 23). Le SEC-Na et le Tri-HR, tous deux hydrosolubles, diffusent essentiellement par les espaces intercellulaires; le degré d'inhibition dû au gonflement est donc plus important pour ces deux dérivés. De ce fait, on peut supposer que les substances fortement polaires, comme le SEC-Na et le Tri-HR, sont absorbées, dans les conditions habituelles (tampon- Na^+), essentiellement par diffusion le long des canaux intercellulaires existant entre

les cellules muqueuses adjacentes et que la CAT (ou le SEC-Na sous forme non ionisée) suit principalement la voie lipidique.

Cette interprétation du passage *in vitro* à travers l'intestin éversé ne contraste pas avec les expériences effectuées sur les membranes non poreuses (membranes liquides et membranes solides de lécithine), où l'on a pu mettre en évidence que seule la CAT est transférée significativement à travers une phase lipidique.

E. Influence du temps d'incubation sur l'intégrité structurale de l'intestin grêle

Levine et coll.¹⁶³ ont observé que les sacs de l'intestin grêle du rat sont morphologiquement indemnes immédiatement après éversion, mais perdent progressivement leur intégrité structurale.

Après 5 minutes d'incubation dans une solution tampon à 37° C, l'intestin provenant de rats sacrifiés par décapitation présente des signes de dégénérescence; après 30 minutes, 50-75% de l'épithélium se sont détachés; au bout d'une heure, il n'y a plus trace de bordure épithéliale. Cette détérioration est plus lente dans les tissus provenant d'animaux sacrifiés sous anesthésie. Même après 1 heure d'incubation, l'aspect général du tissu est très proche de l'épithélium intestinal normal et seulement 10 à 15% des cellules épithéliales se sont détachées.

Cette investigation histologique importante de Levine nous a amené à contrôler l'intégrité structurale de l'intestin éversé en relation avec le transport passif des flavonoïdes.

Pour ce contrôle, nous avons repris la méthode de *Gibaldi et Grundhofer*¹⁷⁷ en déterminant les vitesses de transfert après différentes périodes d'incubation de l'intestin éversé dans la solution tampon. Cette méthode permet d'attribuer l'augmentation progressive des clearances au cours de l'expérience à des altérations structurales et fonctionnelles de la préparation intestinale. La modification de la perméabilité de l'intestin éversé, en fonction du temps, est présentée dans le tableau 24.

Tableau 24

Perméabilité de l'intestin éversé du rat en fonction du temps

Flavo- noïdes	Clearances période I ^(a) [ml/h]	Rapports des clearances période IV/période I	Rapports des clearances période IV/période II	Rapports des clearances période IV/période III
CAT	0,167(+0,011) *	1,95	1,39	0,99
SEC-Na	0,283(+0,002) *	1,55	1,26	1,09
Tri-HR	0,102(+0,003) *	2,10	1,35	1,00

(a) clearance = 2 (quantité transférée en 30 minutes) / concentration muqueuse

* les valeurs entre parenthèses expriment l'écart-type de la moyenne de trois expériences

Les périodes I à IV représentent respectivement quatre périodes consécutives de 30 minutes. L'augmentation de la clearance dans la période IV, par rapport à celle dans la période I, s'élève à 110% pour le Tri-HR, 95% pour la CAT et 55% pour le SEC-Na.

L'augmentation croissante des valeurs de clearance en fonction du temps peut être expliquée en prenant en considération les points suivants¹⁷⁷ :

- a) le temps de latence nécessaire à l'accumulation tissulaire précédant la vitesse en régime constant
- b) l'altération structurale et fonctionnelle et même
- c) l'ensemble de ces deux mécanismes.

Si l'accumulation tissulaire était la cause du changement de la clearance en fonction du temps, la clearance initiale devrait être la même, que l'intestin soit incubé ou non dans la solution tampon pendant un temps déterminé. Les résultats de l'influence de l'incubation sur la perméabilité de l'intestin sont représentés par les figures 52-54 et groupés dans le tableau 25.

Tableau 25

Influence de l'incubation sur la perméabilité de l'intestin éversé du rat

Flavonoïdes	Quantités transférées en 30 min (mg) + S*			
	sans incubation	30 min incubation	60 min incubation	90 min incubation
CAT	0,166 (+0,010)	0,145 (+0,010)	0,249 (+0,011)	0,330 (+0,011)
SEC-Na	0,283 (+0,002)	0,230 (+0,021)	0,341 (+0,013)	0,364 (+0,002)
Tri-HR	0,102 (+0,003)	0,091 (+0,002)	0,129 (+0,003)	0,202 (+0,009)

* écart-type de la moyenne de 3 expériences

[3g]

FIG. 52 ABSORPTION INTESTINALE (SAC EVERSE)

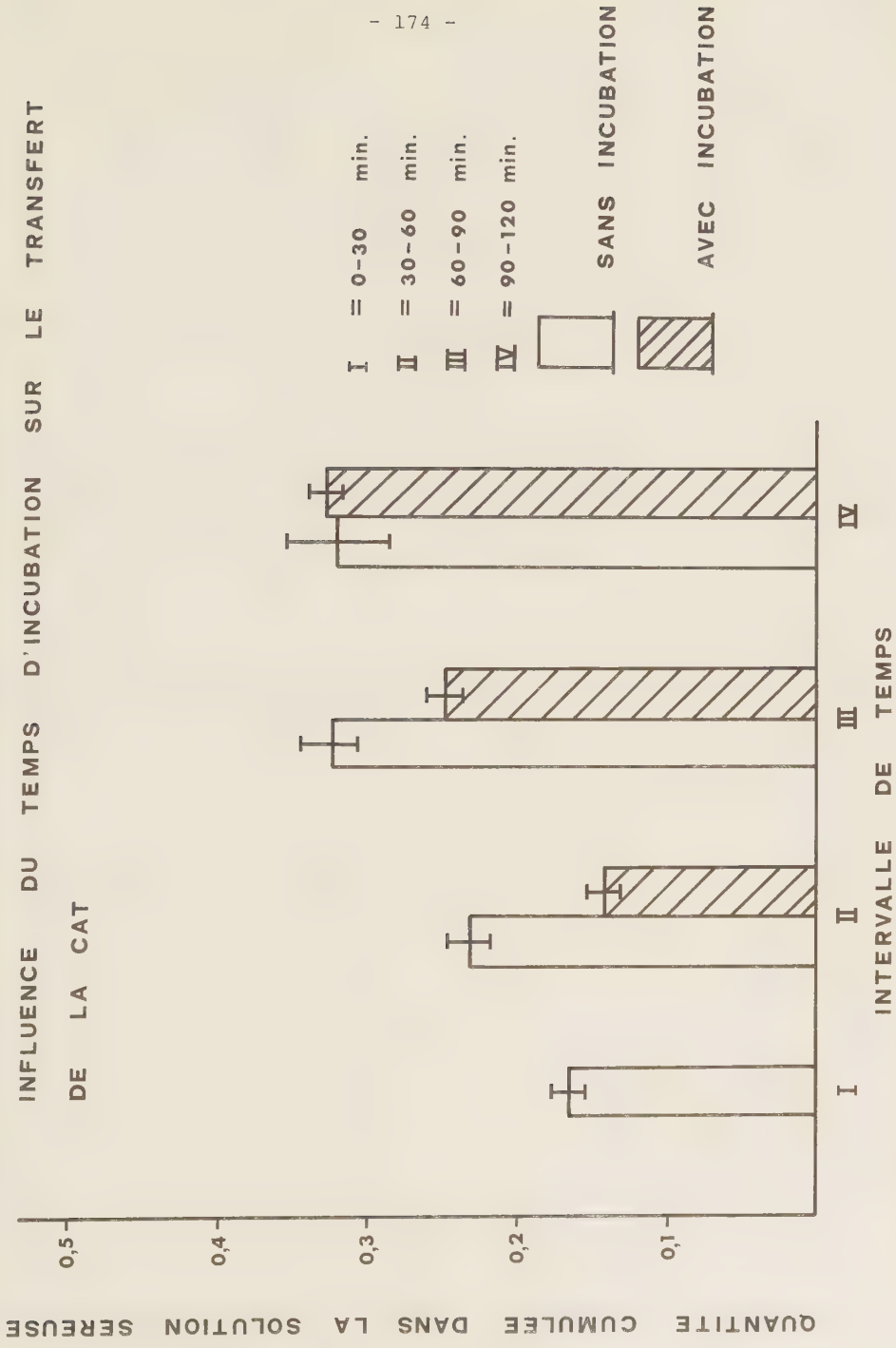


FIG. 53 ABSORPTION INTESTINALE (SAC EVERSE)

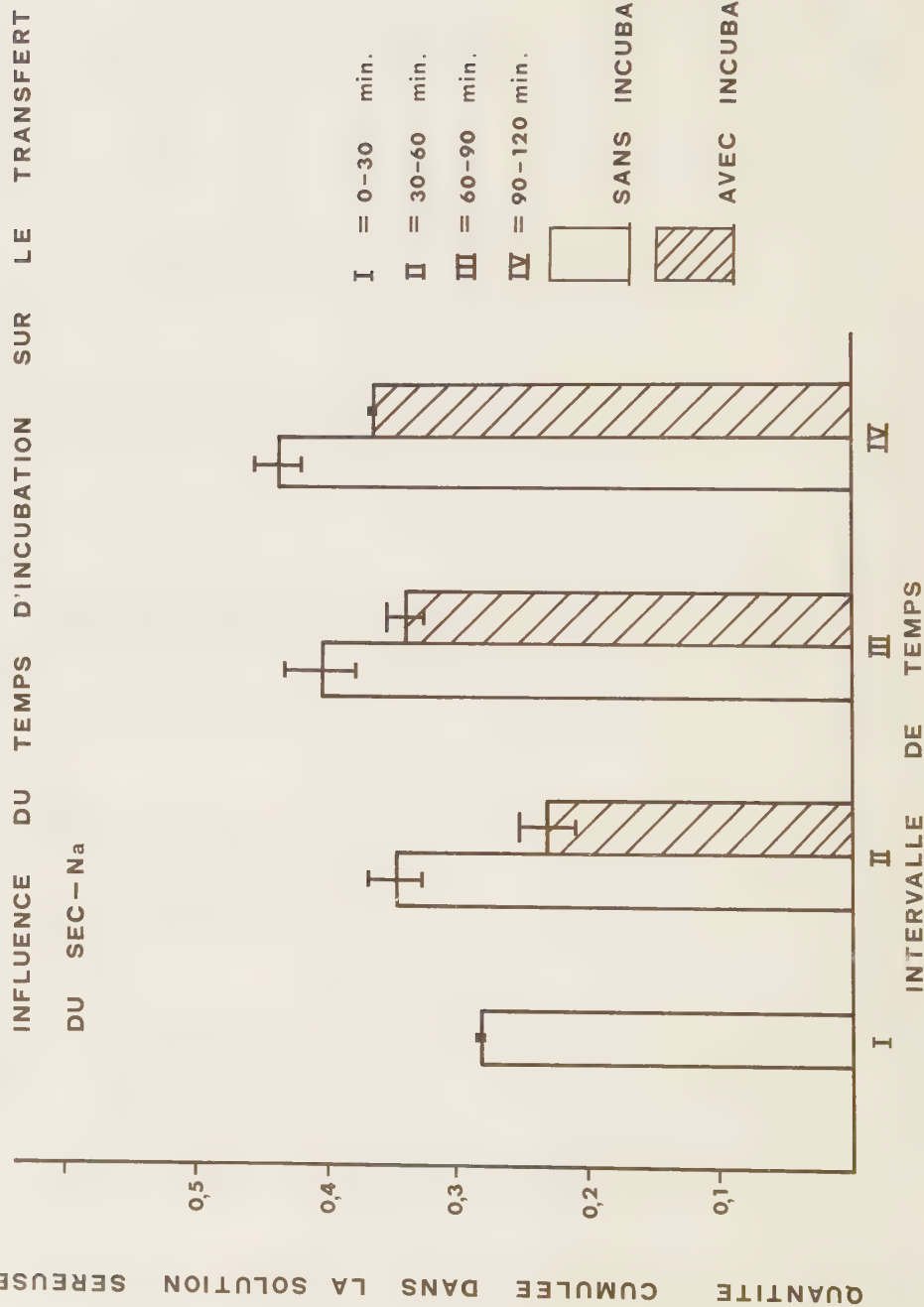
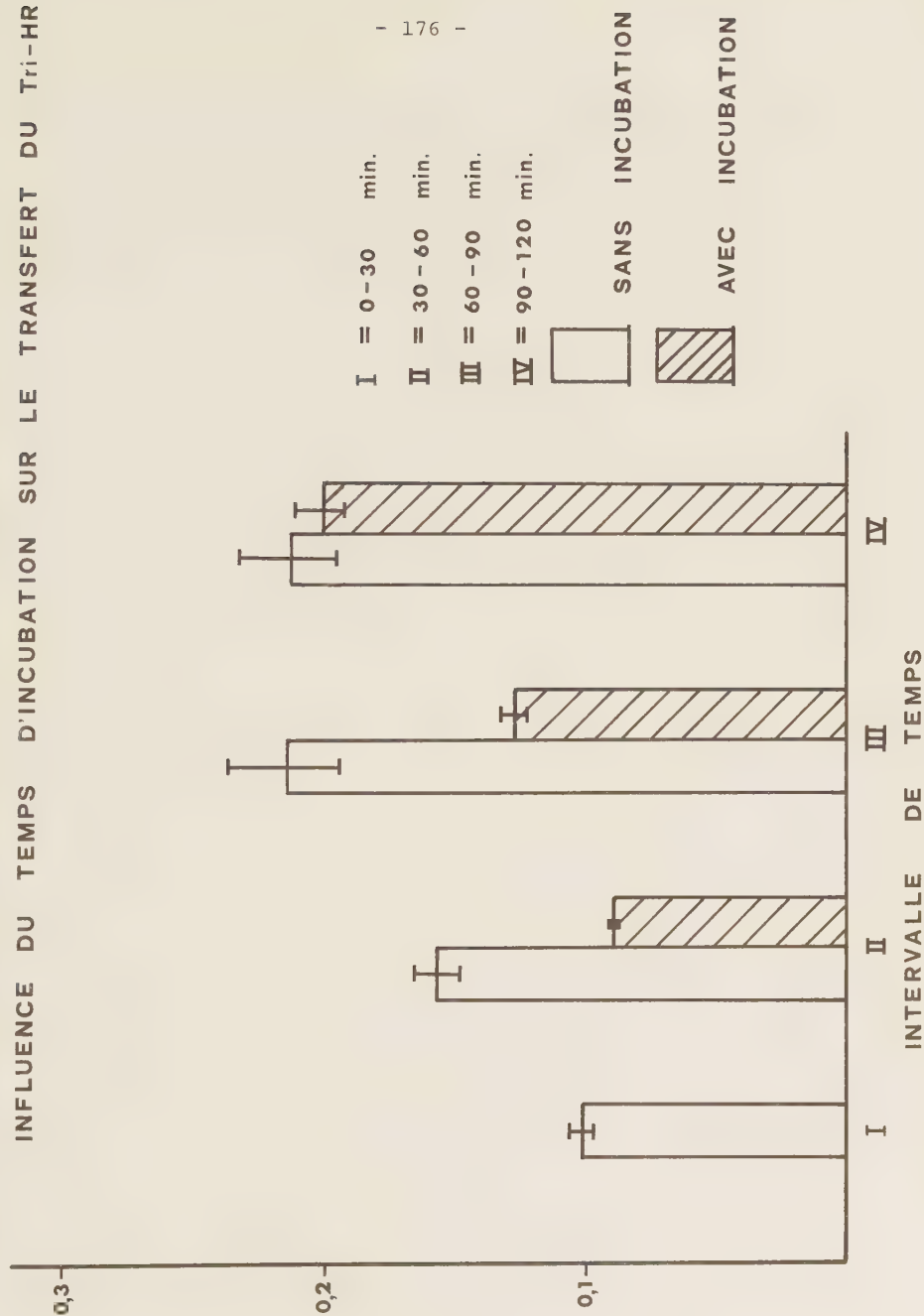


FIG. 54 ABSORPTION INTESTINALE (SAC EVERSE)

INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION SUR LE TRANSFERT DU Tri-HR

[mg]



Les données réunies dans ce tableau, indiquent que la perméabilité de l'intestin éversé a diminué de 10 à 20% après 30 minutes d'incubation et, par contre, a augmenté de 20 à 50% après 60 minutes et de 30 à 100% après 90 minutes pour le transfert des flavonoïdes étudiés.

Cette diminution aberrante, après 30 minutes d'incubation, peut être due à une rétention cellulaire du fluide; celle-ci entraîne une diminution du diamètre effectif de la voie aqueuse, car l'incubation se fait à 30° C, alors que l'expérience avec l'intestin non incubé débute par l'introduction d'un tissu préalablement maintenu dans une solution glacée. En effet, *Levine et coll.*¹⁶³ ont montré que l'accumulation tissulaire de l'eau peut être retardée par un abaissement de la température.

Les figures 52-54 montrent que l'intestin demeure intact pendant les premières 60 minutes; l'augmentation de la vitesse de transfert, sans incubation préalable, est provoquée, pendant cette période, par une accumulation tissulaire de principes actifs.

Entre 60 et 90 minutes, l'accumulation tissulaire et l'altération du tissu contribuent au changement de la vitesse de transfert. Par exemple, pour la CAT, 50% de l'augmentation de la vitesse de transfert, relative à la période I, doivent directement être attribués à l'altération structurale et fonctionnelle de l'intestin éversé et 50% à l'accumulation tissulaire.

Dans la période de 90 à 120 minutes, les proportions correspondant à la perte d'intégrité intestinale sont de l'ordre

suivant : 100, 90 et 50% respectivement pour la CAT, le SEC-Na et le Tri-HR. Cette altération structurale de l'intestin par les flavonoïdes est en parfait accord avec les observations de *Gibaldi et coll.*¹⁷⁷, démontrant que les substances hydrosolubles et polaires ayant une clearance initiale inférieure à 1 ml/h, valeur correspondant à nos dérivés, continuent à augmenter leur vitesse de transfert et que la perte d'intégrité de la préparation contribue à ce phénomène.

Néanmoins, les valeurs de clearance peuvent être corrigées en fonction de cette perte d'intégrité de la manière suivante¹⁷⁸ :

$$II_C = II - (II_i - I) \quad (34)$$

$$III_C = III - (III_i - I) \quad (35)$$

$$IV_C = IV - (IV_i - I) \quad (36)$$

où I, II, III et IV sont les clearances des périodes de prélèvements (expériences sans incubations préalables) se terminant respectivement à 30, 60, 90 et 120 minutes.

La clearance au bout des 30 premières minutes (I) sert de référence, ce qui implique qu'aucune altération fonctionnelle de l'intestin éversé ne se produit pendant cette période initiale. Cette restriction est largement satisfaite¹⁶³. Les valeurs de clearance, obtenues avec les expériences d'incubation dans la solution tampon pendant 30, 60 et 90 minutes, suivies chaque fois de 30 minutes dans la solution contenant le principe

actif, sont représentées respectivement par II_i , III_i et IV_i . Si les valeurs de clearance II_i , III_i et IV_i sont supérieures à la valeur de référence I, cela implique une perte d'intégrité de l'intestin.

Si on calcule la moyenne des clearances de la période I + II, ainsi que celle de la clearance corrigée de la période III + IV (tabl. 26), on constate que ces valeurs moyennes, pour chaque flavonoïde, se sont assez rapprochées l'une de l'autre.

Tableau 26

Valeurs moyennes des clearances I + II ($\bar{X}_{I+II}$), et

$III_c + IV_c$ ($\bar{X}_{III_c+IV_c}$)

Flavonoïdes	$\bar{X}_{I+II} \times 10^3$ [ml/min]	$\bar{X}_{III_c+IV_c} \times 10^3$ [ml/min]
CAT	3,33	3,39 (5,44) *
SEC-Na	5,25	5,86 (7,02) *
Tri-HR	2,18	2,53 (3,55) *

* les valeurs entre parenthèses expriment les moyennes des clearances III + IV ($\bar{X}_{III+IV}$), sans les corrections relatives à l'altération structurale de l'intestin.

Les valeurs corrigées, en fonction de la perte d'intégrité de l'intestin, ne sont que faiblement supérieures aux valeurs moyennes des deux premières périodes (30 et 60 minutes). Ces

résultats signifient qu'après 60 minutes, un transfert trop élevé est dû à l'altération structurale et fonctionnelle de la muqueuse et que l'on doit corriger les paramètres de perméabilité pour la deuxième heure d'expérience.

F. Influence de la musculature mise à nu sur la vitesse de transfert

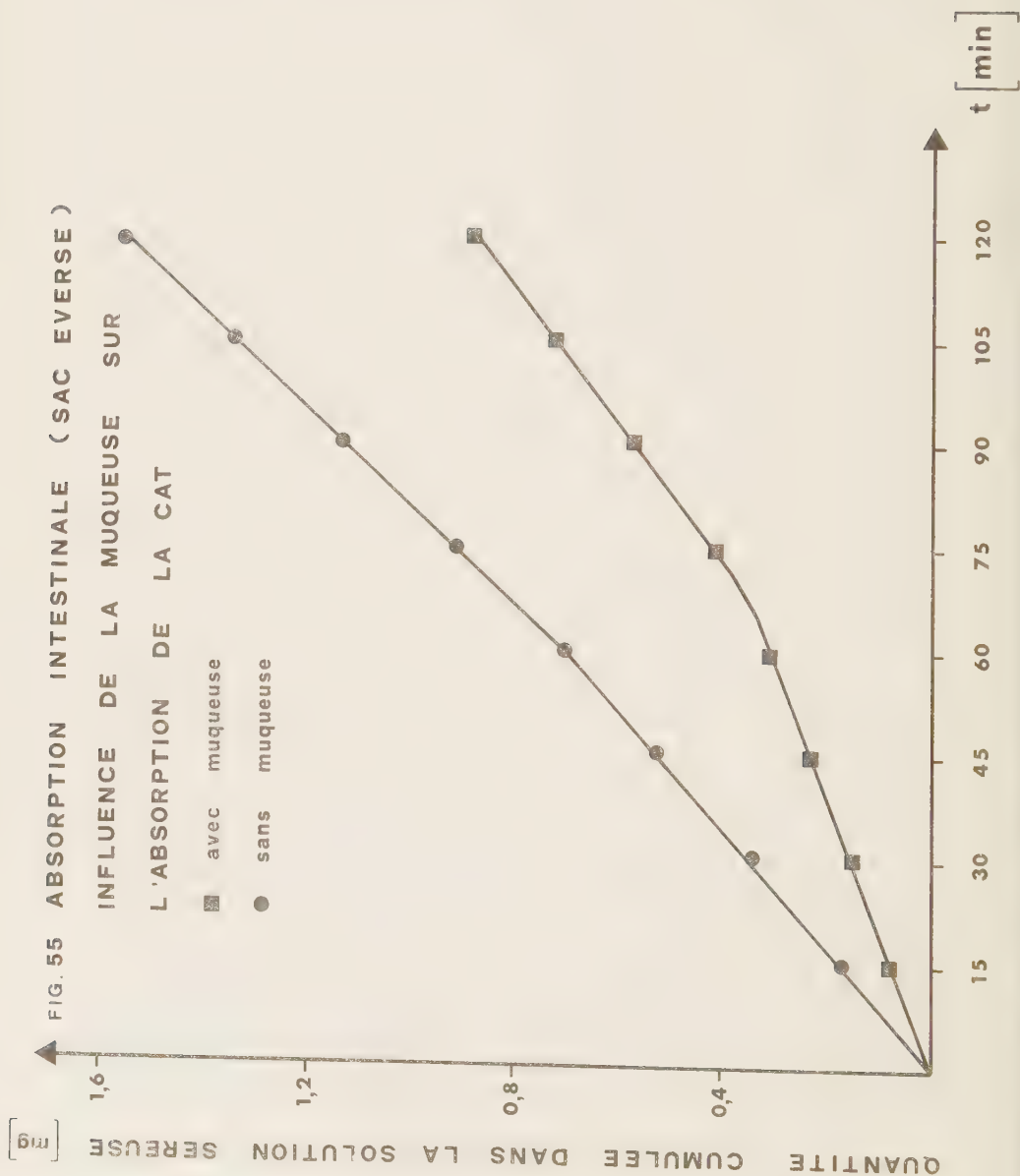
Le but de ces essais est de déterminer le rôle joué par les tissus sous-jacents à l'épithélium, puisque ce dernier manifeste des signes de dégénérescence au cours du temps. Pour cela, on détruit artificiellement les cellules épithéliales. En revanche, les parties plus profondes (tissu conjonctif, tissu musculaire, tissu séreux) demeurent intactes¹⁷⁹ par le procédé utilisé.

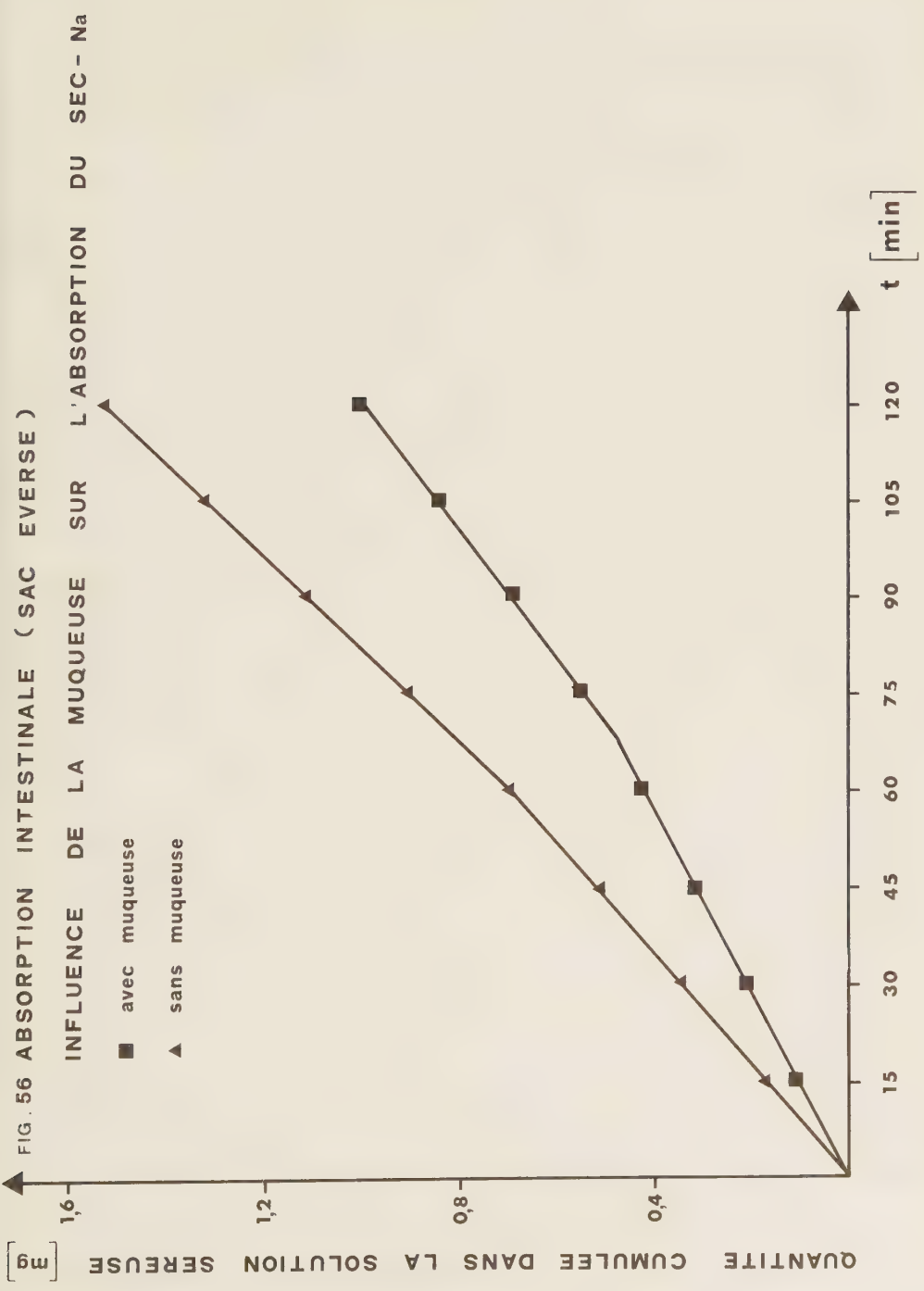
Le mode opératoire du détachement de l'épithélium intestinal du rat a été repris de l'étude de *Nayak et Benet*¹⁷⁹.

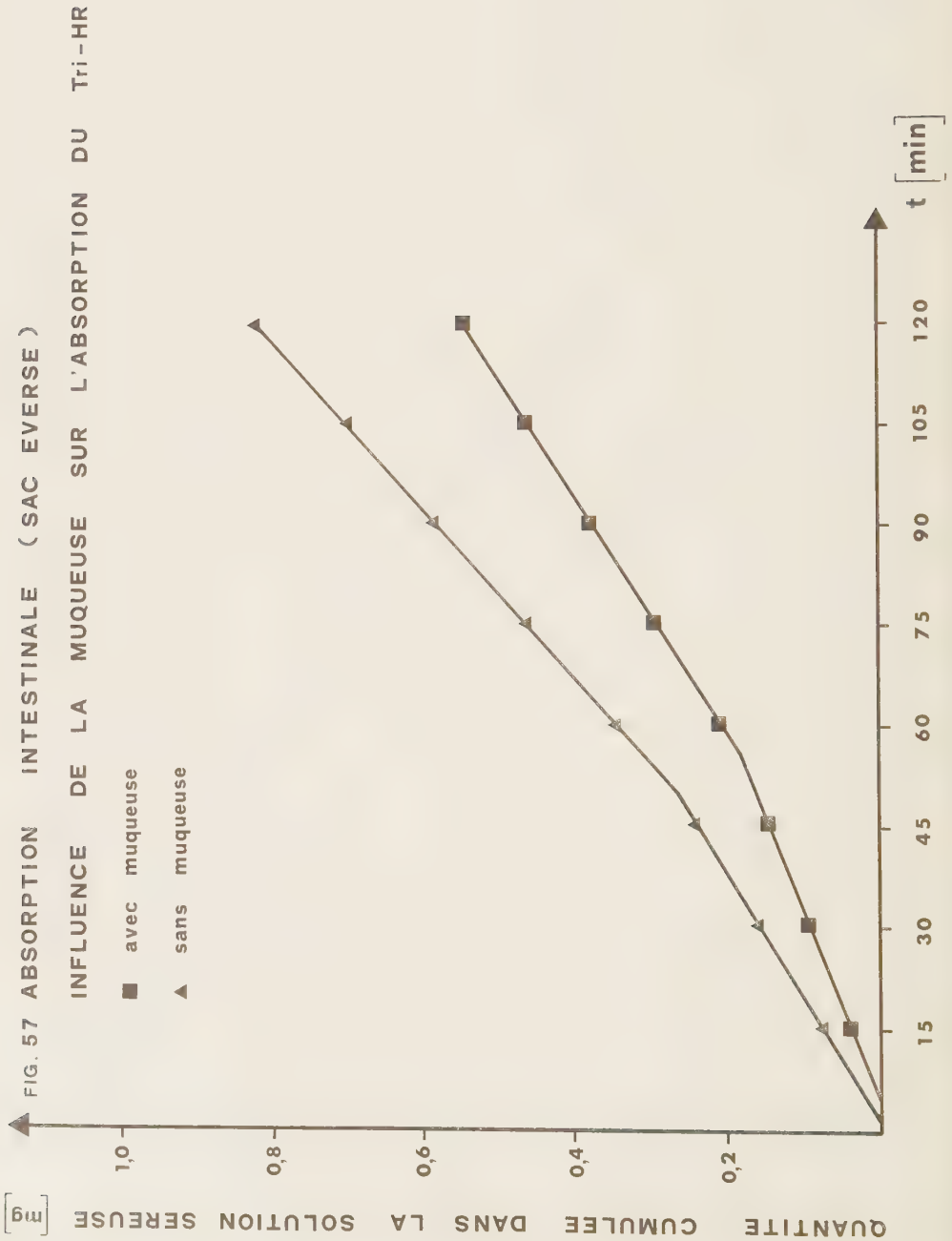
La musculature est une barrière qui ne détermine pas les processus de transport *in vivo*; la connaissance de l'influence de la musculature sur l'absorption *in vitro*, contribue à expliquer les divergences observées entre les deux méthodes.

Les courbes cumulatives des figures 55-57 représentent les phénomènes de transport en fonction du temps à travers la musculature et l'intestin éversé non traité à l'EDTA.

La valeur de la clearance à 60 minutes, indique que la vitesse de transfert à travers la musculature a considérablement augmenté par rapport à l'intestin non traité : l'augmentation est







de l'ordre de 121%, 65% et 66% respectivement pour la CAT, le SEC-Na et le Tri-HR.

Les courbes du transfert à travers la musculature révèlent un passage relativement constant pendant le temps d'expérience, puisque on supprime la variabilité provoquée par l'altération de l'épithélium.

A titre comparatif, le rapport des clearances IV/I (voir tabl. 24), comme mesure de l'altération de la perméabilité, a été modifié avec l'intestin sans épithélium, de la manière suivante : 1,30, 1,35 et 1,72 respectivement pour la CAT, le SEC-Na et le Tri-HR.

Cette expérience montre une fois de plus qu'à part l'altération de l'épithélium en fonction du temps, l'accumulation dans le tissu musculaire ne doit pas être négligée et que l'intestin *in vitro* est une barrière hétérogène. La clearance, calculée à 60 minutes, de l'expérience du transport à travers la musculature mise à nu, est de $5,93 \cdot 10^{-3}$ ml/min pour la CAT et de $5,89 \cdot 10^{-3}$ ml/min pour le SEC-Na; on ne constate ainsi aucune différence significative de la vitesse de transport pour ces deux dérivés flavanoliques.

Par contre, les expériences précédentes ont montré que le SEC-Na est environ 2 fois plus vite transféré que la CAT à travers la paroi intestinale complète.

Ce phénomène indique que les cellules épithéliales représentent le site sélectif du passage de la CAT et du SEC-Na.

Le temps de latence du transfert à travers la musculature est la moitié ou le tiers de celui obtenu précédemment, par diminution de l'épaisseur de la membrane.

IV.2 Méthode d'absorption intestinale *in situ*

IV.2.1 Généralités

Dans le chapitre précédent, nous avons exposé une méthode *in vitro* qui a présenté l'inconvénient majeur que les segments intestinaux, isolés de l'animal, ne sont pas irrigués. Le principe actif est transporté non seulement à travers la vraie barrière membranaire, mais aussi à travers différentes lames musculaires, le tissu conjonctif et toutes les structures tissulaires constituant l'épaisseur globale de la paroi intestinale; par contre, sur l'animal maintenu en vie, les vaisseaux qui irriguent l'intestin grêle sont répandus entre les cellules épithéliales et la musculature. On peut en déduire que les vitesses d'absorption déterminées par les méthodes *in vitro* sont plus lentes que dans la réalité et que l'accumulation dans les tissus est importante.

De plus, comme on l'avait constaté, la perméabilité a considérablement changé dans ces conditions, par détérioration des cellules due à l'absence d'irrigation.

Le terme "*in situ*" qualifie des techniques où l'irrigation sanguine est maintenue intacte. Les vitesses d'absorption déterminées par ces méthodes sont quantitativement plus réalistes que celles mesurées avec la méthode *in vitro*. En étudiant l'absorption *in situ*, on suppose que le principe actif qui a disparu de la lumière intestinale correspond à la quantité absorbée. Ces investigations sont également limitées, puisqu'elles ne révèlent pas directement selon quel processus la substance a pénétré dans la circulation générale ni quelle fraction est accumulée dans les

membranes. La vitesse de disparition du tractus gastro-intestinal ne coïncide pas nécessairement avec la vitesse d'apparition dans le sang. La concentration du principe actif dans la membrane, en fonction du temps, n'est pas aussi facile à déterminer que celle dans les membranes liquides par exemple.

Pour nos expériences d'absorption *in situ*, nous avons adopté la méthode décrite récemment par *Doluisio et coll.*¹⁸⁰, en raison du nombre élevé d'avantages énoncés par ces auteurs :

- a) Les vitesses d'absorption sont réalistes et comparables à celles données par les concentrations sanguines, après ingestion orale du principe actif, chez l'homme ou l'animal.
- b) Le mode opératoire est relativement simple.
- c) Le dispositif est peu coûteux et facilement réalisable.
- d) Les résultats de l'analyse cinétique obtenus avec cette méthode sont satisfaisants.
- e) Les paramètres cinétiques obtenus ne varient que peu d'un animal à l'autre.
- f) Le temps nécessaire à l'obtention de résultats quantitatifs et reproductibles est réduit.

Cette méthode a suscité un large intérêt¹⁸⁰⁻¹⁹¹, surtout en raison de la bonne reproductibilité des résultats.

IV.2.2 Partie expérimentale

A. Mode opératoire

Plusieurs modifications importantes ont été apportées à la méthode originale, décrite par *Doluisio*¹⁸⁶.

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles, Wistar, de 200 à 240 g, maintenus dans des conditions standard d'alimentation et d'habitat. Un jeûne de 16 à 20 h précède le traitement; cependant les rats reçoivent de l'eau ad libitum. Ils sont enfermés dans des cages dont le fond est recouvert d'une grille pour éviter la coprophagie.

Chaque animal est anesthésié par injection intrapéritonéale d'uréthane (1,5 mg/g de poids corporel), environ 1 h avant le début de l'opération chirurgicale. Après une incision abdominale médiane (de 2 cm environ), l'estomac et le caecum sont dégagés et deux canules en verre (en forme de L, diamètre intérieur 3 mm) sont insérées dans des petites fentes transversales situées respectivement aux niveaux du duodénum et de l'iléon. Une canule est dirigée caudalement, à 1 cm de l'extrémité inférieure du canal cholédoque et l'autre en direction opposée, à 1 cm de la jonction iléo-caecale. Chaque canule est maintenue en place par trois ligatures, effectuées à l'aide de fils, puis l'intestin est replacé dans la cavité abdominale. Les manipulations de l'intestin sont réduites au minimum. Pendant la période de la laparotomie et au cours de la fixation des canules, il faut prendre soin de ne pas léser les vaisseaux sanguins.

La lumière intestinale est lavée avec une solution de perfusion à 37° C, en utilisant une pompe péristaltique réglable (Guldener Vario Perpex II), qui permet d'augmenter progressivement le débit; la limpidité de la solution de lavage est contrôlée par spectrophotométrie (= valeurs nulles). La solution de lavage est chassée avec l'air introduit par la pompe péristaltique en utilisant un débit lent pour éviter le gonflement de l'intestin.

La partie extérieure de la canule duodénale est fixée, par l'intermédiaire d'un tuyau en polyéthylène de 3 cm, à une seringue en verre de 20 ml, munie d'un robinet à trois voies. Le reste éventuel de solution de lavage à l'intérieur de l'intestin est éliminé en rinçant celui-ci une fois avec 10 ml de solution à tester, introduite avec la seringue duodénale. Une seringue identique est fixée de la même manière à la canule iléale.

On introduit ensuite doucement 15 ml de solution à tester, préalablement chauffée à 37° C, dans la lumière intestinale avec la seringue adaptée à la canule duodénale, jusqu'à ce que le liquide arrive dans l'autre seringue. On déclenche à ce moment le chronomètre et on effectue le premier prélèvement de 0,1 ml ($t = 0$), dans la seringue iléale; on y prélève également 3 ml que l'on rejette, étant donné que les 15 ml introduits initialement représentent un excès.

Les prélèvements suivants sont effectués alternativement dans les deux seringues toutes les 15 minutes pour assurer un mouvement de liquide sur toute la longueur du segment intestinal. Environ 45 secondes sont nécessaires pour le prélèvement total de la

solution intestinale dans la seringue, son mélange, la prise d'échantillon et sa remise dans le lumen. A la fin de l'expérience, le segment intestinal entre les deux canules est excisé pour en mesurer sa longueur (approximativement 84 cm).

B. Solutions

La solution de perfusion utilisée pour le lavage de l'intestin est identique à celle de *Doluisio* et *coll.*¹⁸⁰. La CAT est dissoute dans le tampon phosphate selon *Sørensen*, de pH = 6,00, à une concentration de 2 mg/ml, additionné de 0,25 mg/ml de rouge de phénol. Cette solution est rendue isotonique par adjonction de NaCl.

C. Dosage par spectrophotométrie

A des temps déterminés, on effectue deux prélèvements de 0,1 ml; l'un, correspondant au dosage de la CAT, est dilué 200 fois puis mesuré à une longueur d'onde de 235 mμ et l'autre, correspondant à la détermination du rouge de phénol, est dilué 100 fois et l'absorption est mesurée à une longueur d'onde de 430 mμ. Le tampon phosphate est utilisé pour la dilution et sert de référence.

Il n'y a pas d'interférence entre CAT et rouge de phénol.

D. Essais préliminaires

a) Changement du volume de la solution muqueuse

Au cours des premières expériences effectuées, nous avons observé un accroissement de la concentration de la CAT, au lieu d'une diminution, dans le lumen intestinal en fonction du temps. Un cycle entérohépatique normal est exclu, puisque le segment d'investigation est situé au delà de l'extrémité inférieure du canal cholédoque. Un passage dans le sens inverse, sang-intestin, de la CAT ou de ses métabolites est exclu à une telle vitesse. Pour ces diverses raisons, nous avons déterminé l'absorption de l'eau.

*Doluisio et coll.*¹⁸⁰ ont indiqué une dispersion de $\pm 10\%$ (± 1 ml) de la concentration en rouge de phénol, concluant que l'absorption de l'eau n'est pas significative dans leurs expériences.

*Hayton et Levy*¹⁸¹, ainsi que *Gibaldi et Grundhofer*¹⁸², ont compensé la perte en eau en ajoutant périodiquement une quantité adéquate de solution physiologique, après chaque prélèvement, pour que le volume de la solution intestinale soit maintenu constant.

*Levy et coll.*¹⁸³ ont hydraté les rats, immédiatement après l'injection d'uréthane, par une injection intrapéritonéale de 5 ml de solution physiologique. Ces auteurs, reprenant la méthode de *Doluisio*¹⁸⁰, ont noté une absorption considérable de l'eau (environ 50% ou 3,5 ml), ce qui est en opposition avec les 10% cités par les premiers auteurs.

*Pelzmann et Havemeyer*¹⁹², utilisant une technique *in situ*, ont trouvé 30 à 40% (4 ml) d'absorption d'eau après une heure.

L'absorption négligeable du rouge de phénol permet son utilisation comme élément marqueur du changement de volume¹⁹³⁻¹⁹⁶.

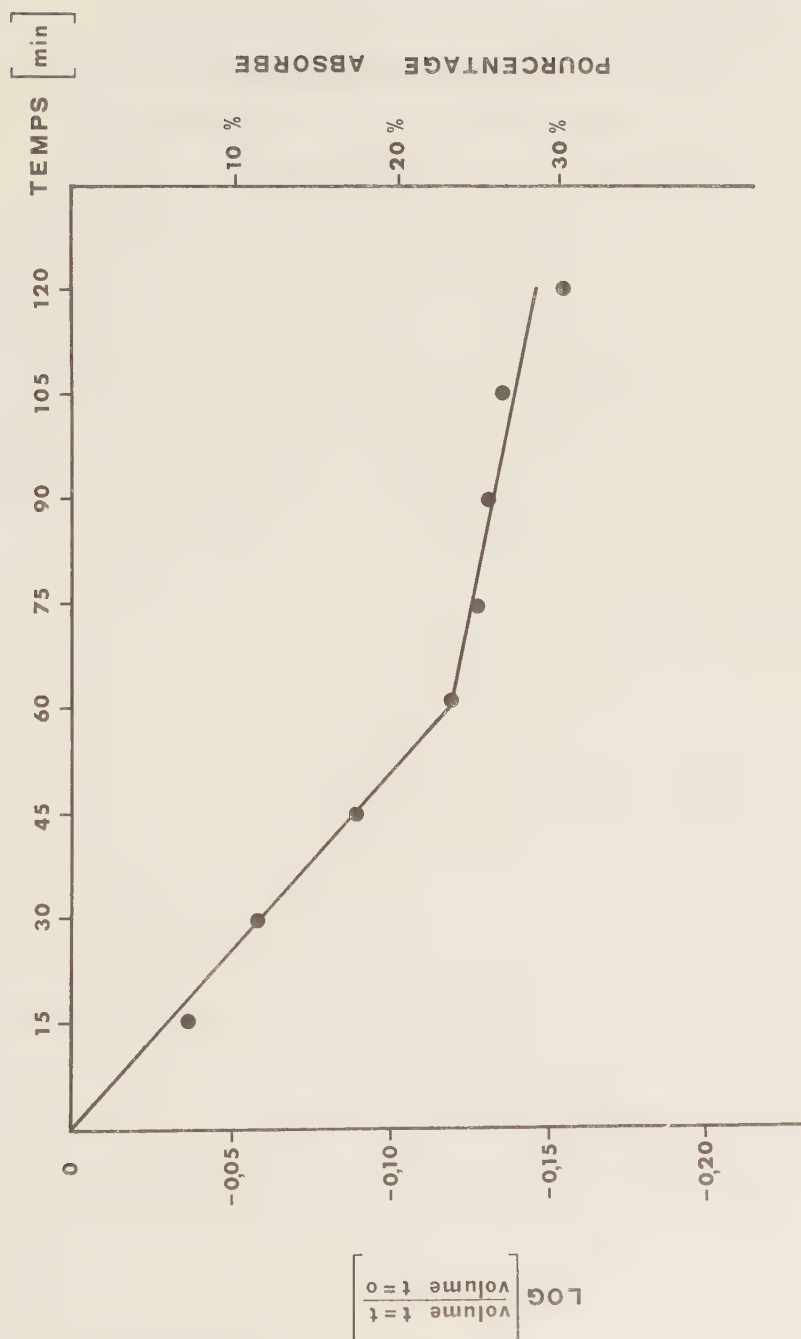
Dans ces essais, le rouge de phénol (concentration initiale 5 mg % dans Sørensen pH = 6,0, rendu isotonique par adjonction de la quantité adéquate de chlorure de sodium) a été mesuré par colorimétrie à 560 mμ, après avoir dilué le prélèvement de 0,1 ml dans 10 ml de NaOH 1 N. Le passage de l'eau est déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\left(1,00 - \frac{C_i}{C_f} \right) \times 100 = \% \text{ d'eau absorbée} \quad (37)$$

où C_i et C_f sont respectivement les concentrations initiales et finales du rouge de phénol.

La figure 58 représente les résultats obtenus avec l'expérience du rouge de phénol utilisé dans le but de déceler l'absorption de l'eau en fonction du temps; après une heure, 24,2% $\pm$ 3,4% (moyenne $\pm$ S, deux rats) ou 3 ml d'eau ont été absorbés par l'intestin du rat. Ce résultat est en accord avec l'observation de *Pelzmann et coll.*¹⁹² qui ont pu mettre en évidence une vitesse d'absorption d'eau de l'ordre de 4 ml/h. Au bout de 60 minutes, la vitesse d'absorption diminue et devient pratiquement constante.

FIG.58 ABSORPTION INTESTINALE DE L'EAU
(METHODE IN-SITU, DETERMINATION AVEC LE ROUGE DE PHENOL)



Dans la période de 60 à 120 minutes, moins de 1 ml d'eau a été absorbé et cette quantité peut être considérée comme négligeable¹⁸⁰.

Pour *Kojima et coll.*¹⁸⁴, le changement de volume peut être appréciable dans la première heure d'expérience, puis devient pratiquement stationnaire dans la deuxième heure.

Cet essai préliminaire effectué sans principe actif nous montre la nécessité de tenir compte de ce changement de volume pour chaque expérience, puisque à la fin des mesures le volume a diminué de $30,1\% \pm 2,5\%$ (moyenne $\pm$ S, deux expériences).

En général, le changement de volume dans l'intestin ligaturé est dû à l'absorption d'eau, qui d'autre part n'est pas compensée par la bile.

b) Variation du pH en fonction du temps

Le pH de la solution physiologique ne dépasse jamais l'intervalle $6,0 \pm 0,3$, révélant la large capacité du tampon et le choix adéquat du pH utilisé pour une étude de l'absorption intestinale.

c) Température

La température rectale du rat a été déterminée avec une sonde thermométrique (Mettler TM 15) avant l'anesthésie, 30 minutes après, au début et à la fin de l'expérience d'absorption. Avant l'anesthésie, la température rectale est de 36°C ; 30 minutes après, elle tombe de 1 à 2°C ; au début de l'expérience, soit environ 2 h après l'injection intrapéritonéale d'uréthane, elle se

située entre 30 et 32° C et reste pratiquement constante ($\pm 1^{\circ}$ C) pendant les 2 h d'absorption intestinale. Cette température est comparable à celle choisie pour les expériences effectuées *in vitro* (30° C).

E. Dosage de la CAT- 14 C par scintillation liquide

a) Solution muqueuse

Une prise d'essai de 10 μ l est mélangée à 10 ml d'Instagel (Packard, Instr. Co). Après refroidissement à $+ 10^{\circ}$ C, la radioactivité de l'échantillon est mesurée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide, Packard modèle Tri-Carb 2425, préalablement étalonné pour la mesure du 14 C. Le rendement de la mesure est déterminé par la méthode de standardisation externe. La radioactivité est convertie en mg de CAT.

b) Sang complet

A la fin de la période d'absorption, le sang (environ 3 ml) a été recueilli par ponction cardiaque dans des tubes héparinisés. La teneur en 14 C a été déterminée à l'aide du spectromètre à scintillation liquide réfrigéré.

On mélange 0,1 ml de sang dans un flacon de comptage avec 0,5 ml d'eau oxygénée à 30% pour décolorer le sang. On ajoute 1,5 ml d'une solution de Soluène^R-100 (Packard Instr. Co) - isopropanol 1 : 1 (vol/vol), on agite immédiatement et on ferme le flacon. Le processus de digestion est achevé au bout de 45 minutes à température ambiante. Après avoir ajouté 15 ml de solution

d'Instagel - HCl 0,5N 9 : 1 (vol/vol) et mélangé en agitant, l'échantillon est prêt au comptage. Le rendement du système de comptage pour le ^{14}C a été calculé selon la méthode citée ci-dessus.

c) Foie

Après avoir rinçé le foie entier avec la solution physiologique, éliminant ainsi l'excès de sang, 50 mg de foie haché (poids humide) sont introduits dans un flacon de comptage et le tissu est recouvert de 1 ml de Soluène^R-100.

Pour faciliter la digestion, on a utilisé une secoueuse à bain thermostatisé à 60° C.

En utilisant ce dispositif, le temps nécessaire à l'obtention de la digestion complète a été réduit à 3 h, du fait que l'échantillon du tissu n'adhère pas au fond du flacon de comptage; l'attaque par le Soluène est ainsi favorisée puisque la surface libre de l'échantillon est augmentée.

Après refroidissement à température ambiante, l'excès d'agent solubilisant est neutralisé par de l'acide acétique glacial, puis on ajoute 15 ml d'Instagel^R.

IV. 2.3 Résultats et interprétation

A. Absorption intestinale de la CAT

La vitesse relative de l'absorption est calculée à partir de la diminution de la concentration intestinale, avec les corrections suivantes pour les changements de volume :

$$\% \text{ non absorbé} = \left(\frac{A}{A_0} \times \frac{I_0}{I} \right) \times 100 \quad (38)$$

où :

A = concentration du principe actif au temps t

A₀ = concentration du principe actif au temps t₀

I = concentration de l'indicateur (rouge de phénol)
au temps t

I₀ = concentration de l'indicateur (rouge de phénol)
au temps t₀

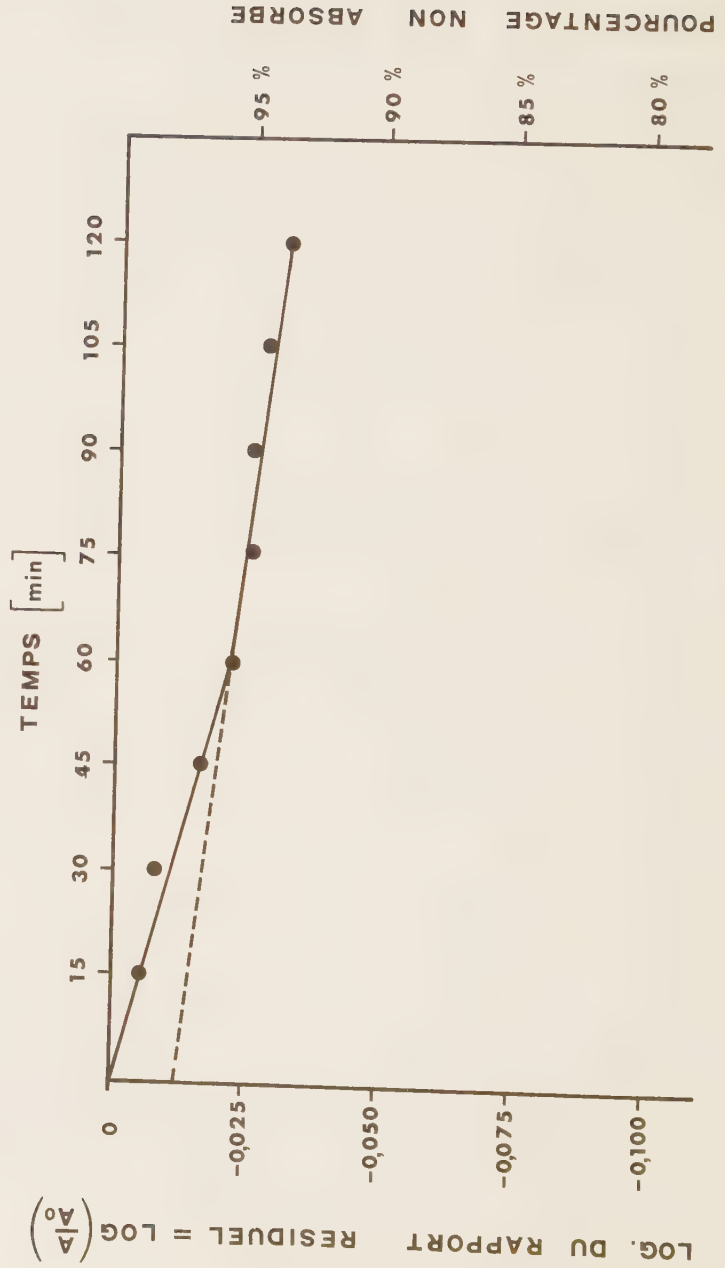
Le pourcentage de principe actif absorbé est obtenu en soustrayant de cent le pourcentage du principe actif non absorbé.

Le quotient A_{corrigé}/A₀ est appelé rapport résiduel du principe actif. La figure 59 représente la disparition de la CAT de la lumière intestinale du rat; elle est plus rapide dans la première moitié de l'expérience que dans la période ultérieure; après 60 minutes, la diminution de la concentration suit une cinétique de premier ordre apparent.

Cette période initiale de disparition, relativement rapide, est due à une accumulation membranaire ou à un changement de la tonicité de la solution muqueuse créé par l'importante modification de volume.

On a pu mettre en évidence avec tous les modèles *in vitro* utilisés jusqu'à présent, que l'accumulation de la CAT dans la membrane joue un rôle important.

FIG. 59 ABSORPTION INTESTINALE DE LA CAT
(METHODE IN-SITU)



Par exemple, le transfert intestinal simulé de la CAT à travers une phase organique est décrit par le schéma suivant :



révélant la forte liposolubilité de la CAT dans la phase d'octanol.

Doluisio et coll.¹⁸⁵ ont examiné l'effet de l'accumulation membranaire sur les cinétiques d'absorption de principes actifs. Ces auteurs ont conclu que dans un modèle à trois compartiments, lorsque l'accumulation dans la membrane est importante, la disparition se manifeste selon un mécanisme bi-exponentiel; au contraire, si l'accumulation est faible ou inexistante, la disparition est mono-exponentielle (cinétique de premier ordre). Le transfert *in vivo* du lumen intestinal (A) dans le sang (C), à travers une barrière (B), peut être représenté, pour un grand nombre de médicaments, de la manière suivante :



Les facteurs concernant le sang, tels que le volume, le pH, la liaison aux protéines, ainsi que la phase distributive importante dans les organes, le métabolisme et l'excrétion rapide, sont susceptibles de diminuer la constante de vitesse de C en B. Par conséquent, le transport *in vivo* de l'intestin dans le sang est souvent caractérisé par un processus irréversible.

En fait, le phénomène biphasique (fig. 59) peut être interprété par une distribution relativement rapide entre le lumen et la membrane, faisant suite à un transfert plus lent et essentiellement irréversible de B en C.

Doluisio et coll.¹⁸⁵ ont toujours observé une phase distributive dans la membrane pour les substances fortement liposolubles, ce qui, selon toute prévision, est applicable à notre cas. En effet, les résultats du modèle à trois compartiments, où B est représenté par une phase liquide, indiquent que la quantité de CAT dans la phase organique atteint une valeur maximum de 47% de la dose au bout de 150 minutes; donc l'accumulation de la CAT paraît importante pendant les processus d'absorption intestinale. Cette accumulation est indépendante des conditions expérimentales, puisque d'une part on est confronté avec des expériences *in situ* et que d'autre part le jeûne, dans nos expériences, ne dépasse jamais 20 h. *Doluisio* et coll.¹⁸⁶ ont supposé que la privation prolongée de nourriture (> 20 h) pourrait diminuer la circulation sanguine dans la muqueuse et sous-muqueuse, ce qui se manifesterait par une accumulation tissulaire du soluté.

Une autre possibilité d'expliquer le caractère non linéaire du graphique (fig. 59) est de tenir compte du changement de la tonicité de la solution intestinale en fonction du temps¹⁸⁴. En effet, puisque l'absorption de l'eau est appréciable pendant la première heure d'expérience, la solution muqueuse a tendance à devenir hypertonique. Dans la deuxième partie de l'expérience, le volume étant constant, la disparition de la CAT suit une

cinétique de premier ordre apparent. Etant donné que la surface effective de l'intestin change en fonction du volume de la solution, la distension, par exemple, altère l'exposition des villosités à la solution muqueuse; deux facteurs caractérisent probablement le processus de disparition de la CAT : la surface et le volume. Pendant la première heure d'expérience, le rapport surface/volume augmente progressivement et atteint une valeur quasiment constante dans la deuxième partie de l'expérience. Selon la loi de Fick, ce changement du rapport surface/volume en fonction du temps est susceptible de modifier la vitesse d'absorption.

La constante de vitesse de disparition (k_{obs}) de la CAT a été déterminée sur des petits intervalles de temps, caractérisés par un changement négligeable du volume (entre 90 et 105 minutes), à l'aide de l'équation¹⁸⁴ suivante :

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303 \log (M_1/M_2)}{t_2 - t_1} \quad (39)$$

où M_1 et M_2 sont respectivement les quantités de principe actif aux temps t_1 et t_2 .

Selon la loi de Fick, k_{obs} est directement proportionnel au rapport surface/volume.

De plus, la méthode décrite par *Kojima et coll.*¹⁸⁴ permet d'exprimer la vitesse de disparition par un coefficient de perméabilité apparent (P_a), indépendant du volume et de la surface.

Les constantes k_{obs} , P_a et la demi-vie de disparition ($t_{1/2}$), obtenue à partir de k_{obs} , sont groupées dans le tableau 27, et révèlent un passage intestinal extrêmement lent de la CAT dans la deuxième partie de l'expérience où les constantes ont été calculées.

Tableau 27

Influence du taurocholate-Na sur l'absorption intestinale de la CAT- ^{14}C
(méthode *in situ*)

Flava- noïde	Taurocho- late-Na	Pourcentages restants ^(a)				$k_{obs} \times 10^4$ [min ⁻¹]	$P_a \times 10^4$ [cm·min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [h]
		60 min	Rapports ^(b)	120 min	Rapports ^(b)			
CAT	0,0%	94,73(+0,65)		92,91(+0,62)		5,3	0,7	20,0
CAT	0,5%	95,25(+0,07)	0,99	89,33(+2,27)	1,04	14,0	1,9	7,6
CAT	1,0%	94,46(+1,17)	1,00	85,21(+0,85)	1,09	19,7	2,6	5,4

(a) moyennes de trois à cinq expériences; les valeurs entre parenthèses indiquent les écart-types

(b) rapports entre les pourcentages moyens non absorbés sans sel biliaire et avec sel biliaire

En comparant la constante $P_a = 0,7 \times 10^{-4}$ (cm·min⁻¹) de l'expérience d'absorption intestinale *in situ* avec celle de la disparition globale de la phase A de pH = 6, $K'_a = 9,21 \times 10^{-4}$ (cm·min⁻¹), calculée à l'aide du modèle *in vitro* à membrane liquide et corrigée par le rapport surface/volume (voir page 119), on peut

admettre que la CAT disparaît 13 fois plus vite avec une phase organique d'octanol.

Cette différence peut être partiellement attribuée à la phase membranaire, l'octanol étant une barrière non "physiologique"; son pouvoir solubilisant pour la CAT est différent de celui de la membrane biologique; d'autre part, cette différence peut provenir d'une meilleure agitation des phases liquides dans le modèle à trois compartiments, entraînant une réduction de l'épaisseur des couches de diffusion.

L'étude de l'influence de différents modes d'agitation des phases liquides a déjà mis en évidence des différences dans les constantes de vitesse. La quantité de CAT absorbée par la méthode *in situ* est légèrement supérieure (7,1% après deux heures d'expérience), à celle mesurée avec le sac éversé (5,3% après une période identique). Ces résultats sont prévisibles, puisque le rapport surface/volume est supérieur à celui du sac éversé; d'autre part, les tissus intestinaux sont irrigués par les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Les résultats sont moins reproductibles même en l'absence d'altération de l'intestin grêle; on pouvait s'y attendre, puisqu'il s'agit cette fois d'un essai sur l'animal et non sur une membrane isolée : ainsi les variations possibles dues à la circulation sanguine ne sont pas éliminées comme dans l'autre cas.

B. Influence du taurocholate-Na sur la vitesse de disparition de la CAT- ^{14}C

A l'aide de la CAT marquée au ^{14}C , nous avons cherché à atteindre un double but : doser la CAT d'une manière sensible en présence de concentrations élevées en taurocholate-Na et rouge de phénol, puis quantifier la distribution de la radioactivité dans le sang et le foie du rat après la période d'absorption intestinale.

Au lieu d'une augmentation de la concentration en CAT dans la lumière intestinale, due à l'absorption de l'eau au cours de l'expérience, le phénomène se présente cette fois selon un ordre inverse : le volume de la solution intestinale augmente après 2 heures de + 10% et + 5% respectivement pour des concentrations en taurocholate de 0,5% et 1,0% en raison de la sécrétion de fluide dans la lumière intestinale.

*Gaginella et coll.*¹⁹⁷ ont observé un effet identique avec le glycocholate de sodium 10^{-1} M. Dans leur cas, la dilution du principe actif dans le lumen s'élève à + 15% après une heure.

L'augmentation du volume dans l'intestin au cours de l'expérience est également conforme à l'étude de *Feldman et coll.*¹⁴⁹ effectuée avec le déoxycholate de sodium 100 mM. Ces auteurs ont trouvé, ce qui est en accord avec nos résultats, qu'en absence de sel biliaire, l'absorption de l'eau est importante et qu'en présence du tensio-actif physiologique l'effet contraire se produit, signifiant que la solution muqueuse se dilue en fonction du temps.

Il est possible que les sels biliaires aient un effet direct sur la perméabilité aqueuse de la membrane.

La figure 60 montre que les deux concentrations micellaires en taurocholate-Na, soit 0,5% et 1,0%, favorisent la diminution de la concentration de la CAT dans le lumen intestinal. Ces deux concentrations exercent une influence marquée sur la vitesse d'absorption finale de la CAT.

Les constantes de vitesse, calculées dans un intervalle de temps où le volume intestinal ne change pratiquement plus (de 90 à 120 min), sont réunies dans le tableau 27.

Ainsi, la présence du taurocholate-Na abaisse significativement la demi-vie de la CAT de l'ordre de 12 et 15 heures, respectivement pour les concentrations de 0,5 et 1,0% en sel biliaire, par rapport à l'expérience sans taurocholate-Na.

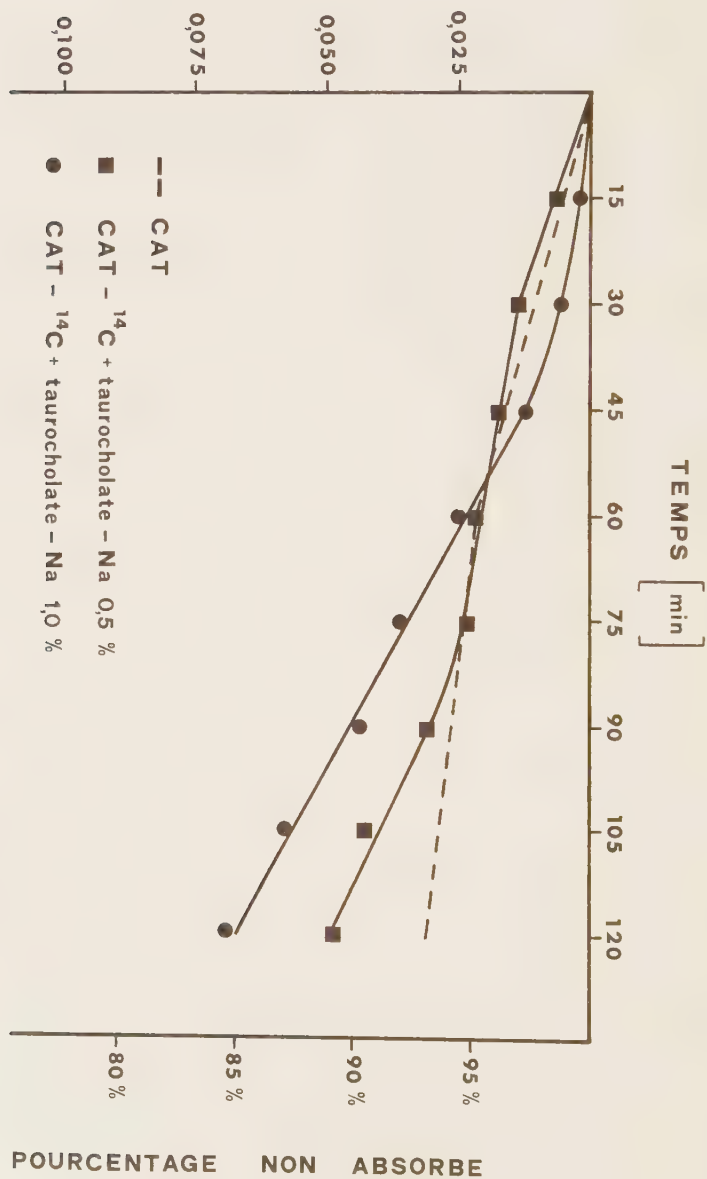
La CAT est absorbée dans l'intestin grêle du rat dans la proportion de $7,09 \pm 0,62\%$ (moyenne $\pm$ S, trois rats) pendant une période d'absorption de 2 heures. Pendant un même temps, $10,67 \pm 2,27\%$ (moyenne $\pm$ S, trois rats) de la CAT sont absorbés en présence de 0,5% de taurocholate-Na et $14,87 \pm 0,85\%$ (moyenne $\pm$ S, trois rats) avec 1%.

Les deux méthodes d'absorption intestinale utilisées, la méthode *in vitro* et la méthode *in situ*, apportent la preuve que le taurocholate-Na à une concentration supérieure à la CMC, favorise le passage de la CAT à travers la membrane biologique; cet effet est plus marqué avec le sac éversé.

Les mécanismes supposés du mode d'action des sels biliaires sur l'absorption de principes actifs peu absorbables ont déjà été mentionnés au chapitre de l'intestin éversé du rat.

$$\text{LOG. DU RAPPORT RESIDUEL} = \text{LOG} \left(\frac{A}{A_0} \right)$$

FIG. 60 ABSORPTION INTESTINALE
(METHODE IN-SITU)



C. Distribution de la CAT-¹⁴C dans le sang et le foie

Afin de confirmer que la vitesse de disparition de la CAT d'une solution intestinale reflète vraiment son absorption, l'activité du ¹⁴C, dans le sang et le foie, a été déterminée immédiatement après la période d'absorption, c'est-à-dire 120 minutes après introduction d'une solution de CAT-¹⁴C dans l'intestin du rat.

Les résultats groupés dans le tableau 28 montrent qu'il y a vraiment absorption et que la disparition croissante de la CAT, contenue dans une solution intestinale en présence de taurocholate, conduit effectivement à des taux de CAT plus élevés dans la biophase.

Tableau 28

Distribution de la CAT-¹⁴C ou de ses métabolites radioactifs dans le sang et le foie deux heures après administration d'une solution de CAT-¹⁴C (2 mg/ml) dans l'intestin du rat

Expériences	%A /ml sang	%A /sang total (a)	%A /g foie (b)	%A /foie total (c)
CAT- ¹⁴ C	0,04(+0,01)	0,60(+0,13)	0,15(+0,03)	0,88(+0,15)
CAT- ¹⁴ C + taurocholate-Na 0,5%	0,10(+0,02)	1,45(+0,31)	0,31(+0,04)	2,04(+0,25)
CAT- ¹⁴ C + taurocholate-Na 1,0%	0,15(+0,04)	2,20(+0,53)	0,39(+0,11)	2,29(+0,62)

pourcentage de la radioactivité administrée; les valeurs expriment les moyennes + les écart-types de trois rats et de trois échantillons d'organes d'un même rat

pour le sang total on a adopté un volume sanguin de 15 ml par rat

poids humide

5,98 + 0,38 g (moyenne du poids humide + écart-type de 12 foies)

Les concentrations radioactives dans le sang et le foie sont significativement ($p < 0,01$) augmentées en présence du taurocholate-Na.

Chez le rat, deux heures après l'introduction du produit marqué dans la lumière intestinale, on retrouve en moyenne 0,04% de la radioactivité administrée par ml de sang. La radioactivité sanguine correspondante augmente d'un facteur de 2,5 et 3,7 respectivement pour des concentrations en taurocholate-Na de 0,5% et 1,0%, par rapport à l'expérience sans sel biliaire.

Le foie retient une plus grande partie de CAT absorbée que le sang. Cependant, la forte masse de sang irriguant cet organe peut éventuellement contribuer à cette concentration plus élevée.

La radioactivité retrouvée par g de foie est de 0,15% par rapport à la radioactivité administrée et ce taux augmente en présence des deux concentrations en taurocholate-Na, respectivement d'un facteur de 2,1 et 2,6.

Le SEC-Na et le Tri-HR ne révélaient aucune absorption significative dans ces conditions expérimentales utilisées. Le fait que le SEC-Na, dérivé le plus absorbé *in vitro* par l'intestin éversé, n'est au contraire pas absorbé *in situ*, nous montre avec quelle prudence il faut extrapoler les résultats d'un modèle *in vitro* pour prédire les phénomènes d'absorption dans un système biologique intact.

Dans un but de comparaison, nous avons cherché à relier les résultats des expériences d'absorption *in vitro* et *in situ* sur le rat avec les données des expériences chez l'homme, empruntées de la littérature.

Das¹⁹⁸ a retrouvé dans les urines des 24 h, après administration orale de CAT chez l'homme (83 mg/kg poids corporel), 7,5% de la dose administrée (CAT inchangée).

Giles et Gumma¹⁹⁹ ont montré que la CAT incorporée dans une forme galénique (comprimés de 3 g) est absorbée chez l'homme à un taux sanguin maximum correspondant à 2,5 - 3% de la dose ingérée après 1 à 2 h.

Wienert et Gahlen²⁰⁰ ont étudié l'élimination du "Tri-HR" après administration d'une dose orale de 3600 mg (12 capsules de Venoruton^R - 300 mg, dans un intervalle de 9 heures) sur l'homme. Ces auteurs ont décelé une absorption minime, inférieure à 1,4% dans les urines des 24 h.

Demole et Guerne²⁰¹ ont étudié la résorption et l'excrétion du Tri-HR chez le lapin. Après administration de Tri-HR (500 mg/kg lapin) par voie orale, ces auteurs ont retrouvé, dans les urines des 24 h, 7,8% de la dose ingérée.

CONCLUSIONS GENERALES ET RESUME

Ce travail a été consacré à la mise au point de plusieurs techniques d'exploration du transport de trois flavonoïdes à travers différents types de membranes, dans le but de comparer la valeur des méthodes d'investigation et de préciser les données que chacune d'elles est susceptible d'apporter.

La première partie de cette étude consiste à étudier le transport *in vitro* à travers des membranes de cellophane. Les résultats obtenus nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

1. Le modèle utilisé assure des résultats statistiquement reproductibles. A une exception près, CAT en présence de taurocholate de sodium , la cinétique de transport est de premier ordre.
2. La vitesse de transport des principes actifs peut être augmentée ou diminuée en présence d'adjuvants. Ces effets sont dépendants de divers facteurs physico-chimiques.
3. Dans la plupart des cas, tensio-actifs et agents viscosifiants entraînent une diminution du coefficient de perméabilité ou ne le modifient pas de manière significative.

4. Le coefficient de perméabilité du SEC-Na augmente en présence de tensio-actifs ou d'un polyélectrolyte anioniques, ce qui s'explique par la théorie de l'équilibre de Donnan.
5. Des variations de pH influencent la vitesse de transport des dérivés flavanoliques.
6. Ces premières investigations fournissent une information rapide sur les effets physico-chimiques susceptibles de modifier la vitesse de transport *in vitro* d'un principe actif.

La seconde partie concerne l'étude du transport *in vitro* à travers des membranes lipidiques composées. Les résultats obtenus conduisent aux conclusions suivantes :

1. La membrane mise au point dans notre laboratoire simule partiellement les propriétés d'une membrane biologique : absence de pores, maintien d'un gradient de pH dans la zone physiologique et teneur en phospholipides.
2. La membrane lipidique préparée présente de très bons caractères de reproductibilité.
3. Elle permet de mettre en évidence le rôle joué par le coefficient de partage dans le processus de transport. La vitesse de transport est d'autant plus élevée que la molécule est plus lipophile; le SEC-Na, de nature très hydrophile, ne passe pas cette barrière.

4. Les cinétiques présentent des périodes de latence importantes, suivies d'un régime constant. La vitesse de transport en régime constant est considérablement retardée par rapport à une membrane poreuse.
5. Les tensio-actifs utilisés freinent le passage de la CAT.
6. Les gradients de pH, simulant les milieux intestinal et gastrique, abaissent significativement le coefficient de perméabilité.

La troisième partie de ce travail traite les résultats obtenus avec le transfert à travers une membrane liquide; ils peuvent être résumés comme suit :

1. Nous avons principalement utilisé la cellule de *Perrin* comme modèle d'étude des membranes liquides.
2. Les constantes de vitesse de premier ordre du transfert réversible à travers les deux interfaces sont calculées à l'aide d'un programme d'ordinateur enregistrant les courbes.
3. Seule la CAT est transférée significativement, en raison de sa forte liposolubilité.
4. Elle est fortement retenue dans la phase organique, ce qui est en opposition avec la situation *in vivo* et réduit la validité du modèle.

5. Il n'y a que peu de différence entre l'absorption gastrique et intestinale simulée. Les variations de pH ne jouent pas un rôle primordial en ce qui concerne la CAT.
6. La vitesse de disparition de la CAT du compartiment gastro-intestinal simulé, en présence d'un agent viscosifiant, est ralentie de moitié.
7. Dans le but de simuler de plus près les processus biologiques, on introduit de la lécithine dans la phase organique. Dans ce cas, toutes les constantes de vitesse sont abaissées. Le changement de la teneur en eau dans la phase organique explique ce phénomène.
8. La conception du modèle joue un rôle important sur le transfert de la CAT. En effet, l'utilisation d'une cellule cylindrique à mouvement rotatoire fournit des constantes de vitesse plus élevées, tout en maintenant un ordre de rang semblable. La différence quantitative de ces constantes subsiste même après leur correction tenant compte des différents rapports surface/volume dont dispose chaque cellule. La différence du mode d'agitation joue un rôle primordial : les interfaces sont continuellement renouvelées.

En conclusion, les expériences effectuées à l'aide de ces deux dispositifs révèlent la difficulté d'établir des corrélations quantitatives entre les paramètres d'absorption *in vitro* et *in vivo*; en effet, les données *in vitro* sont étroitement liées aux conditions expérimentales.

9. Par rapport à la membrane phospholipidique solide, la membrane liquide présente les avantages suivants :
- l'adjonction de composants physiologiques est facile; la phase organique peut être prélevée, ce qui permet de déterminer le coefficient de partage; la membrane ne présente pas la fragilité des membranes solides.
- L'inconvénient majeur de ces modèles à membrane liquide est le rapport défavorable des volumes phase organique/eau. Pour une membrane artificielle solide, ce rapport est plus conforme à celui des membranes biologiques.

La quatrième partie de cette recherche est consacrée à l'absorption intestinale étudiée *in vitro* et *in situ*. Les résultats obtenus avec l'intestin grêle du rat nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

I. Méthode d'absorption intestinale in vitro

1. Les dérivés flavoniques ne sont pas transportés contre un gradient de concentration; il s'agit donc d'un transport passif.
2. L'ordre de rang de la vitesse de transfert des flavonoïdes est le suivant : SEC-Na > CAT > Tri-HR.
3. Des concentrations en taurocholate supérieures à la CMC augmentent significativement les paramètres de perméabilité. Des concentrations inférieures à la CMC n'influencent pas la vitesse de transfert d'une manière significative.

4. Remplaçant quantitativement le sodium par le potassium dans le tampon phosphate utilisé, nous avons mis en évidence une forte diminution du transport de nos substances.

Cette inhibition du transport est directement fonction du poids moléculaire des flavonoïdes, ce qui révèle l'importance du passage par la voie aqueuse, les espaces intercellulaires étant réduits en présence du tampon- K^{+} .

5. L'augmentation des paramètres de perméabilité au cours de l'expérience nous a amené à contrôler l'altération structurale et fonctionnelle de la préparation intestinale.

Ces résultats montrent que l'intestin reste indemne pendant la première heure, alors qu'une altération structurale de l'intestin se produit pendant la deuxième heure. Nous décrivons une méthode de correction des paramètres de perméabilité en fonction de la perte d'intégrité du fragment d'intestin.

6. La musculature étant une barrière qui ne détermine pas le transport *in vivo*, nous l'avons artificiellement mise à nu, pour établir l'importance de ce tissu sur le transport *in vitro*. Les résultats montrent que ce compartiment tissulaire joue un rôle important sur ce type de transfert.

II. Méthode d'absorption intestinale *in situ*

1. Seule la CAT disparaît de la lumière intestinale d'une manière significative. La disparition de la CAT est plus rapide pendant la première moitié de l'expérience (1 h).

L'accumulation tissulaire ou le changement de tonicité explique le phénomène biphasique observé.

2. Les caractéristiques de perméabilité sont exprimées par le coefficient de perméabilité apparent et la demi-vie.
3. La quantité de CAT absorbée est légèrement supérieure, à temps égal, à celle mesurée *in vitro*, le rapport surface/volume étant plus grand et les tissus étant irrigués par les vaisseaux sanguins.
4. Comme dans la partie précédente, le taurocholate joue un rôle accélérateur pour la CAT.
5. La détection de la CAT dans le sang et le foie prouve qu'il y a une absorption réelle et que la diminution de la concentration dans le lumen intestinal ne vient pas seulement d'une accumulation dans la paroi intestinale, d'une dilution dans le lumen par les fluides biologiques ou du métabolisme.
6. A l'augmentation de l'absorption due au taurocholate correspond une augmentation dans les deux tissus examinés.
7. Grâce au maintien de l'irrigation sanguine et aux manipulations peu nombreuses, la paroi intestinale demeure intacte.

En conclusion, les processus de transport des trois flavonoïdes examinés se révèlent très lents, quel que soit le modèle utilisé. Ils peuvent être modifiés significativement par

la présence de différents types d'adjuvants. A cet égard, le taurocholate de sodium joue un rôle particulièrement intéressant.

Les meilleures corrélations avec les mesures effectuées sur l'animal vivant sont obtenues avec les membranes lipidiques composées artificielles et les membranes liquides.

Il est évident qu'aucun modèle ne saurait refléter exactement le transport *in vivo*; cependant chacun apporte des informations importantes et complémentaires sur le mécanisme de transport.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Craig L.C., King T.P. et Stracher A.*, J. Amer. Chem. Soc. 79, 3729 (1957).
2. *Carr C.W., Anderson D. et Miller I.*, Science 125, 1245 (1957).
3. *Cavallito C.J. et Jewell R.*, J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 47, 165 (1958).
4. *Cavallito C.J. et O'Dell T.B.*, J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 47, 169 (1958).
5. *Matsumoto H., Matsumura H. et Iguchi S.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 14, 385 (1966).
6. *Matsumoto H., Matsumura H. et Iguchi S.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 14, 391 (1966).
7. *Matsumoto H.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 14, 398 (1966).
8. *Withington R. et Colett J.H.*, J. Pharm. Pharmacol. 24, Suppl., 131P (1972).
9. *Higuchi T., Kuramoto R., Kennon L., Flanagan T.L. et Polk A.*, J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 43, 646 (1954).
10. *Garrett E.R. et Chemburkar P.B.*, J. Pharm. Sci. 57, 944 (1968).
11. *Garrett E.R. et Chemburkar P.B.*, J. Pharm. Sci. 57, 949 (1968).
12. *Garrett E.R. et Chemburkar P.B.*, J. Pharm. Sci. 57, 1401 (1968).
13. *Flynn G.L. et Smith E.W.*, J. Pharm. Sci. 60, 1713 (1971).
14. *Flynn G.L. et Yalkowsky S.H.*, J. Pharm. Sci. 61, 838 (1972).
15. *Flynn G.L. et Roseman T.J.*, J. Pharm. Sci. 60, 1788 (1971).
16. *Flynn G.L. et Smith R.W.*, J. Pharm. Sci. 61, 61 (1972).
17. *Nakano M. et Patel N.K.*, J. Pharm. Sci. 59, 77 (1970).
18. *Nakano M.*, J. Pharm. Sci. 60, 571 (1971).
19. *Ågren A.*, Acta Pharm. Suecica 5, 37 (1968).

20. Lueck L.M., Wurster D.E., Higuchi T., Lemberger A.P. et Busse L.W., J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 46, 80 (1957).
21. Nogami H., Nagai T. et Sonobe T., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 18, 2101 (1970).
22. Notari R.E., dans Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Marcel Dekker, INC., New York 1971, p. 80.
23. Fites A.L., Banker G.S. et Smolen V.F., J. Pharm. Sci. 59, 610 (1970).
24. Kostenbauder H.B., Borenbaum H.G. et Deluca P.P., J. Pharm. Sci. 58, 753 (1969).
25. Blanpin O., Prod. Pharm. 13, 425 (1958).
26. Bean H.S., Pharm. Acta Helv. 35, 512 (1960).
27. Mysels K.J., Advanc. Chem. Ser. 1967 (Pub. 1969), No 86, 24.
28. Ritschel W.A., Angew. Chem. Internat. Ed. 8, 699 (1969).
29. Heusch R., A.P.V. Informationsdienst 18, 1 (1972).
30. Bates T.R., Gibaldi M. et Kanig J.L., J. Pharm. Sci. 55, 191 (1966).
31. Courbat P., Favre J., Guerne R. et Uhlmann G., Helv. Chim. Acta 49, 1203 (1966).
32. Courbat P., Uhlmann G. et Guerne R., Helv. Chim. Acta 49, 1420 (1966).
33. Goldberg A.H. et Higuchi W.I., J. Pharm. Sci. 57, 1583 (1968).
34. Hathway D.E. et Seakins J.W.T., Biochem. J. 67, 239 (1955).
35. Hathway D.E. et Seakins J.W.T., Nature 176, 218 (1955).
36. Hathway D.E. et Seakins J.W.T., J. Chem. Soc., 1562, A (1957).
37. Schenck G., Dtsch. Apoth. Ztg. 107, 1516 (1967).
38. Nordström C.G., Hakala R. et Karumaa L.J., Suomen Kemistilehti 36B, 102 (1963).
39. Nordström C.G. et Majani C., Suomen Kemistilehti 38B, 239 (1965).
40. Nordström C.G., Suomen Kemistilehti 41B, 351 (1968).
41. Nguyen Q.H., Metche M. et Union E., Bull. Soc. Chim. France 7, 2232 (1966).

42. Mansfield G.H., Swain T. et Nordström C.G., *Nature* 172, 23 (1953).
43. Jurd L. et Horowitz R.M., *J. Org. Chem.* 22, 1618 (1957).
44. Chirikdjian J.J., Jaag E. et Spiegl P., *Mh. Chem.* 100, 1105 (1969).
45. Chirikdjian J.J. et Bleier W., *Sci. Pharm.* 40, 119 (1972).
46. Doelker E. et Buri P., *Pharm. Acta Helv.* 47, 495 (1972).
47. Willard H.H. et coll., *Instrumental Methods of Analysis*, D. van Nostrand Comp., Inc., Princeton, New Jersey, USA, 4ème éd., 1969, p. 94.
48. Ågren A. et Elofsson R., *Acta Pharm. Suecica* 4, 281 (1967).
49. Kabadi B.N. et Hammarlund E.R., *J. Pharm. Sci.* 55, 1072 (1966).
50. Shaffer C.B., Critchfield F.H. et Nair J.H., *J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.)* 39, 344 (1950).
51. Patel N.K., *Can. J. Pharm. Sci.* 2, 97 (1967).
52. Short P.M., Abbs E.T. et Rhodes C.T., *J. Pharm. Sci.* 59, 995 (1970).
53. Breuninger W.B. et Goettsch R.W., *J. Pharm. Sci.* 54, 1487 (1965).
54. Kakemi K., Arita T. et Muranishi S., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 13, 976 (1965).
55. Patel N.K. et Foss N.E., *J. Pharm. Sci.* 53, 94 (1964).
56. Patel N.K. et Kostenbauder H.B., *J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.)* 47, 289 (1958).
57. Higuchi T. et Lach J.L., *J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.)* 43, 465 (1954).
58. Guttmann D. et Higuchi T., *J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.)* 45, 659 (1956).
59. Kabadi B.N. et Hammarlund E.R., *J. Pharm. Sci.* 55, 1069 (1966).
60. Kabadi B.N. et Hammarlund E.R., *J. Pharm. Sci.* 55, 1072 (1966).
61. Ahsan S.S. et Blaug S.M., *Drug Standards* 28, 95 (1960).
62. Ågren A., Elofsson R., Meresaar U. et Nilsson S.O., *Acta Pharm. Suecica* 7, 105 (1970).

63. Suzuki E., Tsukigi M., Muranishi S., Sezaki H. et Kakemi K., J. Pharm. Pharmacol. 24, 138 (1972).
64. Riegelman A. et Crowell W., J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 47, 123 (1958).
65. Lish P.M., Gastroenterology 41, 580 (1961).
66. Dietschy J.M., Salomon H.S. et Siperstein M.D., J. Clin. Invest. 45, 832 (1966).
67. Sartorius Membranfilter, Resorptionsmodell nach Stricker, Anleitung für Einsatz und Auswertung, p. 14.
68. Kennon L. et Higuchi T., J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 45, 157 (1956).
69. Kennon L. et Higuchi T., J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 46, 21 (1957).
70. Aguiar A.J. et Weiner M.A., J. Pharm. Sci. 58, 210 (1969).
71. Bates T.R., Galownia J. et Johns W.H., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 18, 656 (1970).
72. Levy G. et Mroszczak E.J., J. Pharm. Sci. 57, 235 (1968).
73. Nash H.A. et Tobias J.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 476 (1964).
74. Tobias J.M., Agin D.P. et Pawlowsky R., J. Gen. Physiol. 45, 989 (1962).
75. Tobias J.M., Agin D.P. et Pawlowsky R., Circulation 26, 1145 (1962).
76. Leitch G.J. et Tobias J.M., J. Cell. Comp. Physiol. 63, 225 (1964).
77. Mikulecky D.C. et Tobias J.M., J. Cell. Comp. Physiol. 64, 151 (1964).
78. Hayton W.L., Guttmann D.E. et Levy G., J. Pharm. Sci. 61, 356 (1972).
79. Hayton W.L. et Levy G., J. Pharm. Sci. 61, 367 (1972).
80. Stricker H., Pharm. Ind. 31, 794 (1969).
81. Stricker H., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 391 (1970).
82. Stricker H., Pharm. Ind. 33, 157 (1971).
83. Stricker H., Pharm. Ind. 35, 13 (1973).

84. *Stehle R.G. et Higuchi W.I.*, J. Pharm. Sci. 61, 1922 (1972).
85. *Stehle R.G. et Higuchi W.I.*, J. Pharm. Sci. 61, 1931 (1972).
86. *Dibbern H.W. et Scholz G.H.*, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 19, 1140 (1969).
87. *Banaszak L.J. et McDonald H.J.*, *Biochim. Biophys. Acta* 53, 404 (1961).
88. *Lakshminarayanaiah N.*, J. Appl. Polym. Sci. 10, 689 (1966).
89. *Misra A.L., Hunger A. et Keberle H.*, J. Pharm. Pharmacol. 18, 531 (1966).
90. *Fürst W. et Falk M.*, *Pharmazie* 25, 546 (1970).
91. *Weatherby J.H.*, J. Cell. Comp. Physiol. 21, 1 (1943).
92. *Weatherby J.H., Ph. D. et Richmond Va.*, J. Lab. Clin. Med. 28, 1817 (1943).
93. *Weatherby J.H.*, J. Cell. Comp. Physiol. 33, 333 (1949).
94. *Herzog K.A. et Swarbrick J.*, J. Pharm. Sci. 59, 1759 (1970).
95. *Herzog K.A. et Swarbrick J.*, J. Pharm. Sci. 60, 393 (1971).
96. *Herzog K.A. et Swarbrick J.*, J. Pharm. Sci. 60, 1666 (1971).
97. *Hogben C.A.M.*, *Federation Proc.* 19, 864 (1960).
98. *Lieb W.R. et Stein W.D.*, *Nature* 224, 240 (1969).
99. *Daynes H.A.*, *Proc. Roy. Soc., Ser. A*, 97, 286 (1920).
100. *Perrin J. et Saunders L.*, J. Pharm. Pharmacol. 12, 253 (1960).
101. *Hanahan D.J., Turner M.B. et Jayko M.E.*, J. biol. Chem. 192, 623 (1951).
102. *Furusawa S., Okumura K. et Sezaki H.*, J. Pharm. Pharmacol. 24, 272 (1972).
103. *Kapadia A.J., Guess W.L. et Autian J.*, J. Pharm. Sci. 53, 720 (1964).
104. *Kapadia A.J., Guess W.L. et Autian J.*, J. Pharm. Sci. 53, 28 (1964).
105. *Rodell M.B., Guess W.L. et Autian J.*, J. Pharm. Sci. 53, 873 (1964).

106. *Rodell M.B., Bodnar R. et Guess W.L.*, J. Pharm. Sci. 54, 129 (1965).
107. *Rodell M.B., Guess W.L. et Autian J.*, J. Pharm. Sci. 55, 1429 (1966).
108. *Doluisio J.T. et Swintosky J.V.*, J. Pharm. Sci. 53, 597 (1964).
109. *Doluisio J.T. et Swintosky J.V.*, J. Pharm. Sci. 54, 1594 (1965).
110. *Khalil S.A. et Martin A.N.*, J. Pharm. Sci. 56, 1225 (1967).
111. *Bloek L.H. et Lamy P.P.*, Pharm. Acta Helv. 44, 44 (1969).
112. *Lamy P.P.*, Pharm. Acta Helv. 44, 79 (1969).
113. *Kitler M.E. et Lamy P.P.*, Pharm. Acta Helv. 46, 483 (1971).
114. *Robertson J.S. et Bode O.*, J. Pharm. Pharmacol. 22, 423 (1969).
115. *Rosano H.L., Schulman J.H. et Weisbuch J.B.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 457 (1961).
116. *Rosano H.L., Duby P. et Schulman J.H.*, J. Phys. Chem. 65, 1704 (1961).
117. *Rosano H.L. et Breindel K.*, J. Colloid. Interface Sci. 22, 58 (1966).
118. *Perrin J.*, J. Pharm. Pharmacol. 19, 25 (1967).
119. *Perrin J.*, J. Pharm. Sci. 56, 411 (1967).
120. *Augustine M.A. et Swarbrick J.*, J. Pharm. Sci. 59, 314 (1970).
121. *Augustine M.A. et Swarbrick J.*, J. Pharm. Sci. 61, 1656 (1972).
122. *Bastide R., Rouffiac R. et Stanislas E.*, Pharm. Acta Helv. 47, 295 (1972).
123. *Yunker M.H. et Borodkin S.*, J. Pharm. Sci. 60, 52 (1971).
124. *Lippold B.C. et Adel M.S.*, Arch. Pharmaz. 305, 417 (1972).
125. *Shroff A.P. et Shaw C.J.*, Canad. J. Pharm. Sci. 6, 24 (1971).
126. *Schott H.*, J. Pharm. Sci. 62, 341 (1973).
127. *Brodin A. et Nilsson M.I.*, Acta Pharm. Suecica 10, 187 (1973).

128. *Fujita T., Iwasa J. et Hansch C.*, J. Am. Chem. Soc. 86, 5175 (1964).
129. *Shore P.A., Brodie B.B. et Hogben C.A.M.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 119, 361 (1957).
130. *Johnson M.C.R. et Saunders L.*, J. Pharm. Pharmacol. 23, Suppl., 89S (1971).
131. *Wilson T.H. et Wiseman G.*, J. Physiol. 123, 116 (1954).
132. *Wilson T.H. et Landau B.R.*, Am. J. Physiol. 198, 99 (1960).
133. *Wilson T.H. et De Carlo A.*, J. Appl. Physiol. 20, 1102 (1965).
134. *Crane R.K. et Krane S.M.*, Biochim. Biophys. Acta 20, 568 (1956).
135. *Wilson T.H. et Vincent T.N.*, J. biol. Chem. 216, 851 (1955).
136. *Crane R.K. et Wilson T.H.*, J. Appl. Physiol. 12, 145 (1958).
137. *Evered D.F. et Randall H.G.*, Biochem. Pharmacol. 11, 371 (1962).
138. *Herz R., Tapley D.F. et Ross J.E.*, Biochim. Biophys. Acta 53, 273 (1961).
139. *Wiseman G.*, J. Physiol. 120, 63 (1953).
140. *Wiseman G.*, J. Physiol. 133, 626 (1956).
141. *Schanker L.S. et Tocco D.J.*, Biochim. Biophys. Acta 56, 469 (1962).
142. *Schanker L.S. et Jeffrey J.J.*, Nature 190, 727 (1961).
143. *Lack L. et Weiner I.M.*, Am. J. Physiol. 200, 317 (1961).
144. *Faust R.G. et Liu Wu S.M.*, Biochim. Biophys. Acta 120, 299 (1966).
145. *Aguiar A.J. et Fifelski R.J.*, J. Pharm. Sci. 55, 1387 (1966).
146. *Saski W.*, J. Pharm. Sci. 57, 836 (1968).
147. *Feldman S. et Gibaldi M.*, J. Pharm. Sci. 58, 425 (1969).
148. *Feldman S. et Gibaldi M.*, J. Pharm. Sci. 58, 967 (1969).
149. *Feldman S., Salvino M. et Gibaldi M.*, J. Pharm. Sci. 59, 705 (1970).

150. *Reuning R.H. et Levy G.*, J. Pharm. Sci. 57, 1335 (1968).
151. *Reuning R.H. et Levy G.*, J. Pharm. Sci. 57, 1342 (1968).
152. *Reuning R.H. et Levy G.*, J. Pharm. Sci. 58, 79 (1969).
153. *Levy G. et Matsuzawa T.*, J. Pharm. Sci. 54, 1003 (1965).
154. *Masaki B.W., Lien E.J. et Biles J.A.*, Acta Pharm. Suecica 10, 43 (1973).
155. *Levy G. et Angelino N.J.*, J. Pharm. Sci. 57, 1449 (1968).
156. *Kreek M.J., Guggenheim F.G., Ross J.E. et Tapley D.F.*, Biochim. Biophys. Acta 74, 418 (1963).
157. *Clarkson T.W., Cross A.C. et Toole S.R.*, Am. J. Physiol. 200, 1233 (1961).
158. *Krebs H.A.*, Biochim. Biophys. Acta 4, 249 (1950).
159. *Nogami H. et Matsuzawa T.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 9, 532 (1961).
160. *Hogben C.A.M., Tocco D.J., Brodie B.B. et Schanker L.S.*, J. Pharmacol. Exptl. Ther. 125, 275 (1959).
161. *Kakemi K., Arita T., Hori R., Konishi R., Nishimura K., Matsui H. et Nishimura T.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 17, 255 (1969).
162. *Turner R.H., Mehta C.S. et Benet L.Z.*, J. Pharm. Sci. 59, 590 (1970).
163. *Levine R.R., McNary W.F., Kornguth P.J. et Le Blanc R.*, Eur. J. Pharmacol. 9, 211 (1970).
164. *Barr W.H. et Riegelman S.*, J. Pharm. Sci. 59, 154 (1970).
165. *Carey M.C. et Small D.M.*, Am. J. Med. 49, 590 (1970).
166. *Kakemi K., Sezaki H., Konishi R., Kimura T. et Murakami M.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 18, 275 (1970).
167. *Kakemi K., Sezaki H., Konishi R., Kimura T. et Okita A.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 18, 1034 (1970).
168. *Feldman S. et Gibaldi M.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 1031 (1969).
169. *Feldman S., Reinhard M. et Willson C.*, J. Pharm. Sci. 62, 1961 (1973).

170. Lish P.M. et Weikel J.H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1, 501 (1959).
171. Mayersohn M., Gibaldi M. et Grundhofer B., *J. Pharm. Sci.* 60, 1813 (1971).
172. Mayersohn M. et Gibaldi M., *J. Pharm. Sci.* 58, 1429 (1969).
173. Mayersohn M. et Gibaldi M., *Biochim. Biophys. Acta* 196, 296 (1970).
174. Benet L.Z., Orr J.M., Turner R.H. et Webb H.S., *J. Pharm. Sci.* 60, 234 (1971).
175. Mayersohn M. et Gibaldi M., *J. Pharm. Sci.* 60, 225 (1971).
176. Mayersohn M. et Gibaldi M., *J. Pharm. Sci.* 60, 326 (1971).
177. Gibaldi M. et Grundhofer B., *J. Pharm. Sci.* 61, 116 (1972).
178. Perrier D. et Gibaldi M., *J. Pharm. Sci.* 62, 1486 (1973).
179. Nayak R.K. et Benet L.Z., *J. Pharm. Sci.* 60, 1508 (1971).
180. Doluisio J.T., Billups N.F., Dittert L.W., Sugita E.T. et Swintosky J.V., *J. Pharm. Sci.* 58, 1196 (1969).
181. Hayton W.L. et Levy G., *J. Pharm. Sci.* 61, 362 (1972).
182. Gibaldi M. et Grundhofer B., *J. Pharm. Sci.* 62, 343 (1973).
183. Levy G. et Perälä A., *J. Pharm. Sci.* 59, 874 (1970).
184. Kojima S., Smith R.B., Crouthamel W.G. et Doluisio J.T., *J. Pharm. Sci.* 61, 1061 (1972).
185. Doluisio J.T., Crouthamel W.G., Tan G.H. Swintosky J.V. et Dittert L.W., *J. Pharm. Sci.* 59, 72 (1970).
186. Doluisio J.T., Tan G.H., Billups N.F. et Diamond L., *J. Pharm. Sci.* 58, 1200 (1969).
187. Crouthamel W.G., Tan G.H., Dittert L.W. et Doluisio J.T., *J. Pharm. Sci.* 60, 1160 (1971).
188. Kojima S., Smith R.B. et Doluisio J.T., *J. Pharm. Sci.* 60, 1639 (1971).
189. Hayton W.L., Levy G. et Regardh C.G., *J. Pharm. Sci.* 61, 473 (1972).
190. Hayton W.L. et Levy G., *J. Pharm. Sci.* 61, 649 (1972).

191. Kahela P., Perälä A., Ahomaa M. et Voutilainen P., Farm. Aikakausl. 80, 331 (1971).
192. Pelzmann K.S. et Havemeyer R.N., J. Pharm. Sci. 61, 110 (1972).
193. Schanker L.S., Tocco D.J., Brodie B.B. et Hogben C.A.M., J. Pharmacol. Exp. Ther. 123, 81 (1958).
194. Kakemi K., Arita T., Hori R. et Konishi R., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 15, 1534 (1967).
195. Nogami H. et Hanano M., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 11, 395 (1963).
196. Schedl H.P. et Clifton J.A., Gastroenterology 41, 491 (1961).
197. Gaginella T.S., Bass P., Perrin J.H. et Vallner J.J., J. Pharm. Sci. 62, 1121 (1973).
198. Das N.P., Biochem. Pharmacol. 20, 3435 (1971).
199. Giles A.R. et Gumma A., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 98 (1973).
200. Wienert V. et Gahlen W., Hautarzt 21, 278 (1970).
201. Demole V. et Guerne R., Helv. Physiol. Acta 18, C 18 (1960).

